

# **A humán P53 fehérje transzkripció elongációban betöltött, eddig nem azonosított szerepének jellemzése**

Ph.D. értekezés

Készítette: Borsos Barbara Nikolett

Témavezetők: Prof. Dr. Boros Imre Miklós

Dr. Pankotai Tibor

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

Szeged

2017

# 1. Tartalomjegyzék

<b>1. TARTALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>2</b>
<b>2. BEVEZETÉS .....</b>	<b>4</b>
2.1. Az eukarióta transzkripció szabályozása .....	4
2.2. Az eukarióta transzkripció elakadásának okai és az aktinomicin D hatásmechanizmusa .....	7
2.3. A P53 általános jellemzése .....	9
2.4. A P53 szerepe a génexpresszió gátlásában .....	12
2.5. A P53 proteoszómális és proteoszóma-független bontása .....	13
2.6. A P53 fehérje és a transzkripciós blokk kapcsolata .....	14
2.7. A P53, mint transzkripció elongációs faktor .....	15
<b>3. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>17</b>
<b>4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK .....</b>	<b>19</b>
4.1. U2OS sejtek fenntartása .....	19
4.2. U2OS sejtek viabilitásának mérése tripán kék festéssel.....	19
4.3. U2OS sejtek kezelése AktD-vel, MG132-vel, valamint Calpain V inhibitorral .....	19
4.4. Immuncitokémia .....	19
4.5. CSK immuncitokémia .....	20
4.6. Western blot.....	20
4.7. ChIP-seq analízis .....	21
4.8. Kromatin immunprecipitáció (ChIP).....	21
4.8.1. Kromatin preparálás.....	21
4.8.2. Immunprecipitáció és keresztkötés megszüntetése.....	22
4.8.2.1. Kromatin előtisztítása.....	22
4.8.2.2. Immunprecipitáció .....	22
4.8.2.3. Mosás, eluálás és DNS kicsapás .....	22
4.9. Ko-immunprecipitáció.....	23
4.9.1. Sejtek feltárása .....	23
4.9.2. Protein A/Sepharose gyöngyök duzzasztása.....	23
4.9.3. Előtisztítási lépés .....	24
4.9.4. Immunprecipitáció .....	24
4.10. U2OS sejtek transzfekciója siRNS-sel .....	24

4.11. Poli-ubiquitilált fehérje pull-down .....	24
4.12. Propídium-jodid festés.....	25
<b>5. EREDMÉNYEK .....</b>	<b>28</b>
5.1. Az aktinomicin D koncentrációtól függően befolyásolja a U2OS sejtek túlélését.....	28
5.2. Az aktinomicin D kezelés a sejtciklus fázisainak eltolódását okozza .....	29
5.3. A P53 és az RPB1 összfehérje szintje ellentétesen változik AktD kezelés hatására....	31
5.4. A P53 és az RPB1 együttes lokalizációja figyelhető meg AktD kezelés hatására .....	34
5.5. Az AktD magas koncentrációban kettős-szálú DNS töréseket idéz elő, mely a transzkripció folyamatának leállításához vezet .....	38
5.6. A P53 kötődése megfigyelhető transzkripciósan aktív géneken .....	40
5.7. Az RPB1 és a P53 fehérje kötődése megfigyelhető olyan génszakaszokon, melyek nem tartoznak a P53 közvetlen célgénjei közé.....	41
5.8. A P53 kölcsönhat az RPB1-gyel .....	46
5.9. A P53-nak szerepe van az S2P RPB1 ubiquitilációjában transzkripció elongációs blokk esetében .....	48
5.10. Transzkripció elongációs blokk esetén az RPB1 ubiquitin-függő lebontását a 26S proteoszóma végzi .....	50
5.11. A P53 AktD és MG132 kezelést követő fehérje szint csökkenése nem a fehérje kalpain proteázok által szabályozott degradációjának következménye .....	54
<b>6. EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....</b>	<b>56</b>
<b>7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....</b>	<b>61</b>
<b>8. A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ÖSSZEFOGLALÓJA .....</b>	<b>63</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>67</b>
<b>10. IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>71</b>
<b>11. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>82</b>
<b>12. PUBLIKÁCIÓS LISTA .....</b>	<b>85</b>
<b>13. TÁMOGATÁSOK.....</b>	<b>86</b>

## 2. Bevezetés

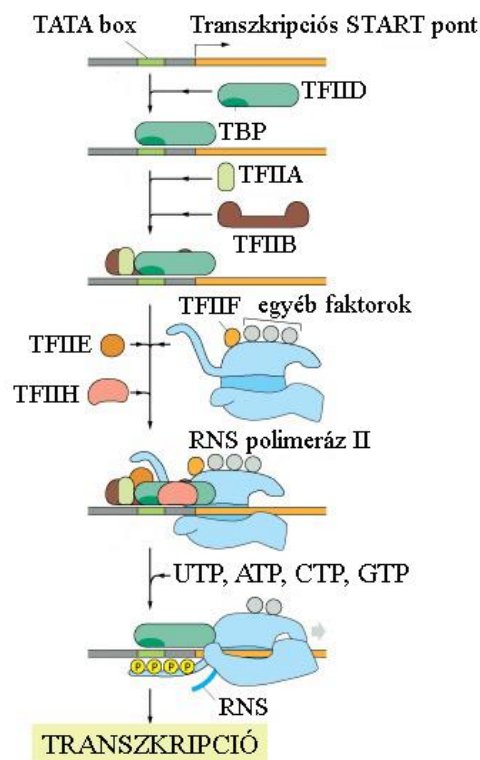
### 2.1. Az eukarióta transzkripció szabályozása

Eukarióta sejtekben az RNS polimeráz enzimnek három típusa ismert: RNS polimeráz I, II és III (RNSPI, RNSPII és RNSPIII). Ezek közül a 12 alegységből (RPB1-12) felépülő RNSPII felelős a fehérjéket kódoló gének és számos kis sejtmagi RNS átírásáért (5). Az enzim legnagyobb alegységének, az RPB1-nek, a karboxi terminális doménje (CTD) az egész élővilágban egy jól konzervált, Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser heptapeptid ismétlődéseiből áll (6). A heptapeptid szerin és treonin aminosavainak foszforilációs állapota kináz és foszfatáz enzimek működésének eredményeként dinamikusan változik a transzkripció folyamán, és jelzésként szolgál a transzkripcióval járó változatos folyamatokhoz (7).

A RNSPII enzim által katalizált transzkripció három fő lépésre különíthető el: iniciáció, elongáció és termináció (8). Az iniciáció első lépéseiben a promóter régiónál preiniciációs komplex (PIC) alakul ki a nem foszforilált RNSPII-ből, a transzkripciós faktorokból (TFIIA, -B, -D, -E, -F és -H) és a mediátor komplexből (9). Az RNSPII kötődése a promóterhez és a PIC kialakulása gyakran a transzkripció sebesség-meghatározó lépése (10). Az eukarióta RNSPII és a bakteriális core RNS polimeráz működésükben hasonlóságot mutatnak abban a tekintetben, hogy a bakteriális enzim csak a szigma faktor jelenlétében képes kötődni a prokarióta gének promóter régiójához, az eukarióta RNSPII-nek pedig általános transzkripciós faktorok segítenek a promóterek felismerésében (11).

Az eukarióta iniciáció első lépéseként a TFIID kötődik a gének promóter régiójában található TATA elemhez (12). A TFIID egy 1,2 MDa-os komplex, amely a TBP-n (TATA-binding protein) kívül még 13-14 TAF-ot (TBP-associated factor) tartalmaz (13). A TFIID és a TATA elem közti szekvencia-specifikus kölcsönhatás kialakításában főként a TFIID TBP alegysége vesz részt. A TFIID kötődése után egy járulékos transzkripciós faktor, a TFIIA kapcsolódik, majd a TFIIB is belép a komplexbe (14). A TFIIB-TFIID-DNS komplexet az RNSPII és a TFIIF ismeri fel, majd a TFIIIE és a TFIIH is bekötődik (2). Az RNSPII-ből és az általános transzkripciós faktorokból jön létre a PIC komplex (**1. ábra**). A TFII faktorok, amelyek számos esetben maguk is több alegységből felépülő komplexek, szerkezetükben eltérőek és más-más funkcióval vesznek részt a transzkripció iniciációban. A PIC komplex összeszerelődésének kezdetén a TFIIA stabilizálja a TFIID-DNS, vagy a TFIIB-TFIID-DNS komplexet, ezáltal segítve a transzkripciós aktivátorok hatását (15). A

TFIIB monomer az RNSPII promóterhez történő kötődéséhez szükséges. A TFIIF heterodimer egy nagyon stabil komplexet alkot az RNSPII-vel (16), míg a TFIIE heterotetramer feltehetőleg az egyes-szálú DNS-hez kötődve stabilizálja a nyitott promóter komplexet (17-20). A PIC második legnagyobb méretű tagja a TFIIH, ami egy 10 alegységből álló multiprotein komplex. Az általános transzkripció faktorok többségétől eltérően a TFIIH számos katalitikus aktivitással rendelkezik: DNS-függő ATP-áz, ATP-függő DNS-helikáz és szerin/treonin kináz. Az utóbbi aktivitással az RPB1 CTD-jét foszforilálja (21). A TFIIH részt vesz a promóter felnyitásában, valamint alegységei közül kettő, az ERCC2 (Excision Repair Cross-Complementation Group 2) és az ERCC3 (Excision Repair Cross-Complementation Group 3) a DNS hibajavítás folyamatának fontos résztvevői, ami arra utal, hogy a TFIIH komplex a transzkripcióban betöltött szerepe mellett a DNS hibajavító mechanizmusokban is szerepet játszik (20) (22).



### 1. ábra A preiniciációs komplex összeszerelődésének folyamata

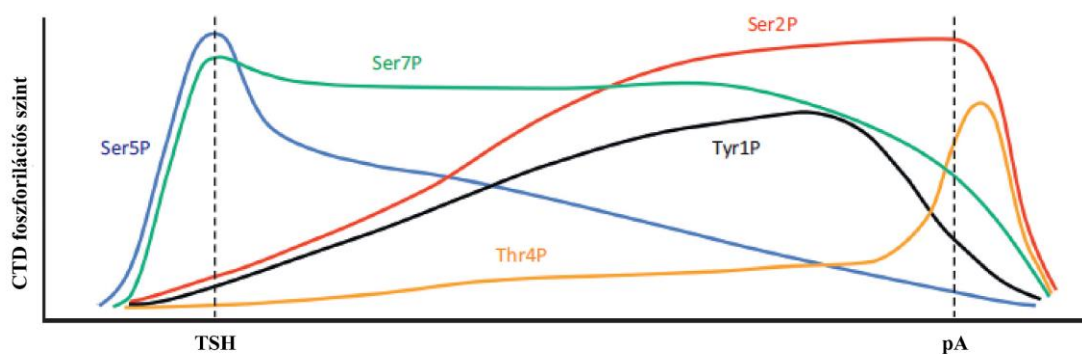
Elsőként a TFIID kötődik a TATA elemhez. Ezt követi a TFIIB, majd a nem foszforilált RNSPII és TFIIF, végül pedig a TFIIE és TFIIH kapcsolódása. Az elongáció előtt az RNSPII nagy alegységének (RPB1) C-terminális doménje (CTD) foszforilálódik (2).

A PIC összeszerelődését követően, nukleozid-trifoszfátok jelenlétében, a DNS-szálak egymástól való szétválásával a transzkripció start helyénél (TSH) transzkripció buborék jön létre (10). Ezt követően az RNSPII és az általános transzkripció faktorok közti kapcsolat megszűnik, az RNSPII elmozdul a promóter régióról, majd kezdetét veszi az RNS átírás folyamata (23). A prokarióta szigma faktorhoz hasonlóan, az eukarióta általános transzkripció faktorok többsége is az iniciáció végén disszociál az RNSPII komplexről, így ezek az elongációban már nem vesznek részt (11).

A transzkripció elindulásához szükséges, hogy az RNSPII legnagyobb alegységének (RPB1) CTD-jét kinázok foszforilálják. Iniciációkor a TFIIH komplex CDK-7 (Cyclin dependent kinase 7) alegysége az RPB1 CTD heptapeptidek 5. szerin (S5) aminosavait foszforilálja, az elongáció kezdeti fázisában pedig a P-TEFb (Positive transcription elongation factor b) komplex CDK-9 (Cyclin dependent kinase 9) alegysége foszforilálja a 2. pozícióban levő szerineket (S2) (10). Ennek megfelelően az iniciációra jellemző S5P RPB1 forma a TSH környékén figyelhető meg, míg az elongációra jellemző S2P forma az átíró gén egész szakaszán kimutatható (24). A CDK-7 az RPB1 CTD heptapeptidek S7 aminosavait, a CDK-9 pedig a treonin 4 aminosavait (T4) is foszforilálja (25-27). Továbbá a közelmúltban kimutatták, hogy a PLK3 (Polo-like kinase 3) is részt vesz a T4 foszforilációjában (28). Az RPB1 CTD heptapeptidek tirozin 1 (Y1) aminosavain bekövetkező foszforilációt az ABL1 (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) és az ABL2 (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2) tirozin kinázok végzik (29,30) (**2. ábra**). Ahhoz, hogy új transzkripció ciklus kezdődjön, a terminációt követően az RNSPII-nek ismét defoszforilált állapotba kell kerülnie, és a transzkripció dinamikus folyamatához is szükséges, hogy az RPB1 a meghatározott aminosavakon defoszforilálódjon. Ebben a folyamatban az FCP1 (TFIIH-associating CTD phosphatase 1) és az SSU72 (SSU72 Homolog, RNA Polymerase II CTD Phosphatase) foszfatázok játszanak szerepet. Az FCP1 főként az S2P, míg az SSU72 az S5P és az S7P aminosavak defoszforilációját végzi (31-36).

Drosophila és humán sejtekben a legtöbb átíró gén promóter régiójában több RNSPII mutatható ki, mint a kódoló részben (10). Ennek oka részben az, hogy az RNSPII az elongáció kezdetén, az iniciáció kezdőpontjától 20-25 bázispárra lévő szakaszon egy ideig leáll, ezt nevezzük RNSPII „promoter-proximal pausing”-nak (37-39). Ennek oka az, hogy a NELF (Negative elongation factor) és a DSIF (DRB sensitivity inducing factor) faktorok kapcsolódnak a korai elongációs komplexhez, és megakadályozzák a transzkripció elongáció folytatását (39,40). Amennyiben valamilyen stresszhatás éri a sejtet, a

NELF/DSIF komplex DNS-hez kötött állapotban tartja az RNSPII komplexet, így megakadályozva egy esetleg hibás transzkripciós folyamatot (41). A transzkripció elongáció elindításában a P-TEFb fontos szerepet tölt be: (I) egyrészt foszforilálja a NELF/DSIF komplexet, melynek következtében a leállt RNSPII el tud mozdulni a promóter régióról, lehetővé téve a transzkripció elongációs szakaszának elindulását, (II) másrészt foszforilálja az RPB1 CTD S2 aminosavait, ezzel egyfajta platformot biztosítva a különböző kromatin módosító faktorok számára, melyek a foszforilált CTD-hez kötődnek és hozzájárulnak a transzkripció folyamatának hatékony végbemeneteléséhez (38,42,43).



## 2. ábra Az RPB1 CTD-jének foszforilációs mintázata a transzkripció során

A CTD Tyr1, Ser2, Thr4, Ser5 és Ser7 aminosavain történő foszforiláció mértéke különböző színnel van feltüntetve (1).

### 2.2. Az eukarióta transzkripció elakadásának okai és az aktinomicin D hatásmechanizmusa

A DNS károsodások rendszerint gátolják a transzkripció folyamatát, ezért szükség van olyan mechanizmusok aktiválására a sejtben, melyek feloldják a transzkripciós blokkot és lehetővé teszik a nukleotidokat érintő hibák kijavítását (44). DNS károsodás esetén az RNSPII „proofreading” aktivitása segítségével képes eltávolítani a hibás RNS nukleotidot, illetve az RNSPII visszalépését („backtracking”) követően lehetővé válik a hibás nukleotidot tartalmazó RNS szakasz kivágása azáltal, hogy a TFIIS elongációs faktor hatására indukálódik az RNSPII ribonukleáz aktivitása (45).

A transzkripciós blokkal járó DNS károsodások javításában a NER (Nucleotide excision repair) egyik útvonala, a TC-NER (Transcription-coupled NER) vesz részt (46,47). A NER

egy több fehérje működése által biztosított hibajavító rendszer, amely az UV-sugárzás által indukált CPD-k (Cyclobutane pyrimidin dimers), 6-4 PP-k (6-4 photoproducts) és különböző vegyi anyagok hatására keletkező, módosított DNS formák eltávolítását végzi. A TC-NER funkciója azonban az átíró szálon keletkezett DNS hibák javítására korlátozódik (44).

Ezen túlmenően a transzkripció blokk az RPB1 poli-ubiquitiláció által közvetített degradációját is eredményezheti (48-51). Az RNSPII DNS-ről történő eltávolítása lehetővé teszi a TC-NER hibajavító faktorok hozzáférését a keletkezett DNS-léziókhoz (48). A DNS hibajavító faktorok közül a CSA (Cockayne syndrome A), a BRCA1 (Breast cancer 1) -BARD1 (BRCA1-associated RING domain protein 1) komplex és a NEDD4 (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4) szerepet játszanak az RNSPII ubiquitilációjában (48,52-56). Abban az esetben, ha a DNS hibajavítás után a transzkripció nem tud újraindulni, a poli-ubiquitilált RNSPII a 26S proteoszómában lebomlik (24,57). Továbbá DNS károsodást követően az RNSPII hiperfoszforilált állapotban marad, hogy ne tudjon egy újabb transzkripció ciklust elindítani (58).

A proteoszóma kötődése megfigyelhető a transzkripciósan aktív génrégiókban is (59). Továbbá a proteoszóma főként a hiperfoszforilált RPB1-et bontja le, ami azt jelzi, hogy az RNSPII transzkripció elongációra jellemző aktív formája kötőhelyként szolgál az ubiquitin ligázok számára, amelyek az RNSPII poli-ubiquitilációját katalizálják (50).

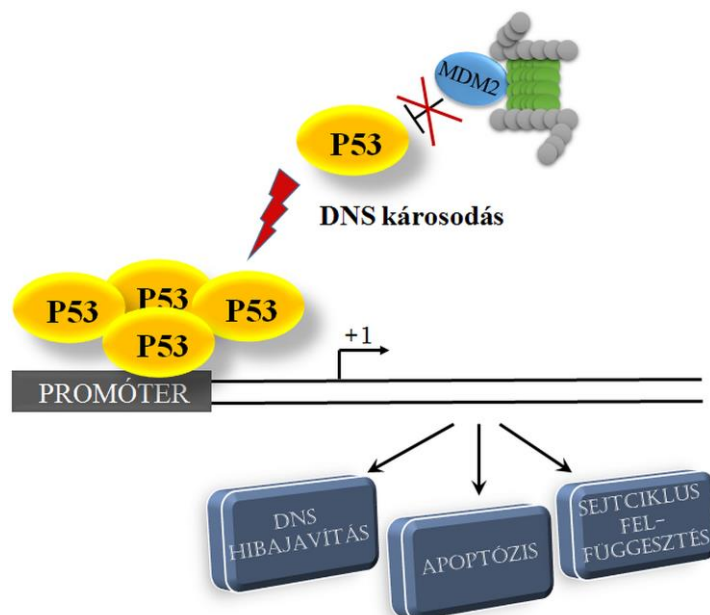
A transzkripció blokk kiváltható drogokkal is. Az aktinomicin D (AktD) az egyik legrégebben ismert kemoterápiás szer, melyet gyakran alkalmaznak gesztációs trofoblaszt tumor, hererák, Wilms-tumor, rhabdomyosarkóma és Ewing-sarkóma kezelésére. Az AktD hatással van az RNSPI, RNSPII és RNSPIII által katalizált transzkripció folyamatára is (60). Elsődlegesen a GC-gazdag szekvenciaregionoknál épül be a DNS bázisai közé, ami akadályozza az RNSP haladását a DNS-en (61). Az AktD alacsony, illetve magas koncentrációban alkalmazva különböző eredménnyel fejti ki hatását. Alacsony dózisu AktD a nutlin-3 MDM2 (Murine double minute 2) inhibitor hatását mimikálja, míg magas koncentrációban kettős-szálú DNS töréseket indukálhat, aminek következtében transzkripció elongációs blokk alakul ki (62). Az RNSPI által átírt magas guanin és citozin tartalmú rRNS gének transzkripciója a legérzékenyebb az AktD kezelésre, ezért a riboszómális RNS transzkripció gátlása AktD kezeléssel szabad riboszómális fehérjék felhalmozódásához vezet. Ezek kölcsönhatnak az MDM2 ubiquitin ligázzal és gátolják azt, aminek a végeredménye a P53 fehérje szint emelkedése (62-65). Az AktD magas



koncentrációban akadályozza a topoizomeráz I és II működését, ezáltal kettős-szálú DNS törések jönnek létre (66).

### 2.3. A P53 általános jellemzése

DNS károsodást követően a P53 különböző szignalizációs útvonalakat aktivál, melyek arra szolgálnak, hogy működésükkel a sejt megszüntesse a károsodást, illetve annak hatását, vagy ha ennek lehetősége nem áll fenn, beindítsa a programozott sejthalált. A DNS károsodás mértékétől függően a P53 transzkripciós faktorként számos gén transzkripcióját aktiválja, melyek a sejtciklus felfüggesztésben, illetve apoptózis indukciójában játszanak szerepet (3. ábra) (67-69).



### 3. ábra A DNS károsodás hatására bekövetkező P53 által szabályozott aktivációs útvonalak

Alapállapotban a P53 fehérje alacsony szinten van jelen a sejtekben, mert az MDM2 (Mouse double minute 2 homolog) ubiquitin ligáz ubiquitilálja, amely ezt követően a P53 proteasómális degradációját okozza. DNS károsodást követően a P53 felszabadul az MDM2 gátlása alól, mivel az MDM2-t a 26S proteasóma lebontja. Ezután a P53 tetramerként kötődik célgénjei promóter régióján lévő specifikus szekvencia részletekhez, mely indukálja célgénjei transzkripcióját. Ezáltal a P53 a DNS hibajavító, apoptózist aktiváló, illetve a sejtciklust leállító folyamatok aktiválását eredményezi.

A P53 által szabályozott sejtciklus felfüggesztése lehetőséget biztosít a károsodott DNS kijavítására. Miután a DNS hibajavító faktorok kijavították a keletkezett DNS hibákat, a sejtciklus tovább folytatódik (70). Komolyabb DNS károsodást követően azonban a P53 apoptózist indukál pro-apoptotikus faktorokat felszabadítva a mitokondriumból. A P53 által aktivált pro-apoptotikus gének közé tartoznak a Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) család tagjai: *Bax*, *Noxa* és *Puma* és a halál receptorok: Fas és DR5 (71,72).

Alapállapotban a P53 nagyon alacsony szinten van jelen a sejtekben, főként az MDM2 (Mouse double minute 2 homolog) által szabályozott proteoszómális degradációjának következtében, azonban DNS károsodást követően a P53 fehérje felhalmozódik a sejtmagban (**3. ábra**) (73,74). A megemelkedett fehérje szintben szerepet játszik a P53 fehérje lebontásának gátlása, valamint különböző aminosavain történő poszttranszlációs módosításai (foszforiláció, acetiláció) is, melyek egyaránt hozzájárulnak a fehérje stabilizálódásához (70).

A P53 három funkcionális doménnel rendelkezik: amino-terminális transzaktivációs, DNS-kötő és egy karboxi-terminális, oligomerizációs doménnel (3,67,68,75,76) (**4. ábra**). Különböző genotoxikus stressz hatására a P53 fehérje DNS-kötő doménje segítségével kötődik konszenzus P53 válasz elemekhez (RRRCWWGYYY, ahol R = adenin vagy guanin; W = adenin vagy timin; Y = citozin vagy timin) (77,78). A P53 válaszelemek főként célgénjei promóter régiójában, a TSH-tól upstream régiókban találhatók (pl. *P21*, *Noxa*), azonban néhány esetben a TSH közelében (pl. *HDM2*, *PCNA*), vagy korai intronikus szekvenciákban (pl. *Puma*, *Pig3*), illetve exonokban (pl. *miR-34a*) is elhelyezkedhetnek (79). Mivel a P53 transzkripció faktoraként a sejtmagban specifikus DNS szekvencia részletekhez kötődve fejti ki hatását, fontos, hogy DNS károsodás esetén bejusson a sejtmagba. Ehhez járul hozzá a P53 szekvenciájában lévő három sejtmagi lokalizációs szignál (NLS), melyeket importin  $\alpha/\beta$  komplexek ismernek fel és segítik a P53 bejutását a sejtmagba (80). Ezen kívül a P53 tartalmaz egy Leu-gazdag sejtmagi export szignált is (NES), melyet a receptor fehérjék karioferin  $\beta$  családjába tartozó CRM1 (chromosomal region maintenance 1) ismer fel, ezáltal a fehérje sejtmagból való kijutását teszi lehetővé (81). A P53 NES-e nem hozzáférhető abban az esetben, ha a fehérje tetramerként van jelen a sejtmagban, melynek következtében gátolt a P53 sejtmagi exportja (82). Ezzel ellentétben, a P53 karboxi-terminális részén bekövetkező MDM2-által szabályozott mono-ubiquitiláció hatására a tetramer forma szétesik, ami lehetővé teszi a CRM1 hozzáférését a NES-hez, ezáltal pedig a P53 sejtmagi exportját aktiválja (83). Ezen

kívül a P53 szekvenciájában egy prolin-gazdag régió (PGR) is található, melynek a P53 pro-apoptotikus aktivitásában van jelentős szerepe (84,85).

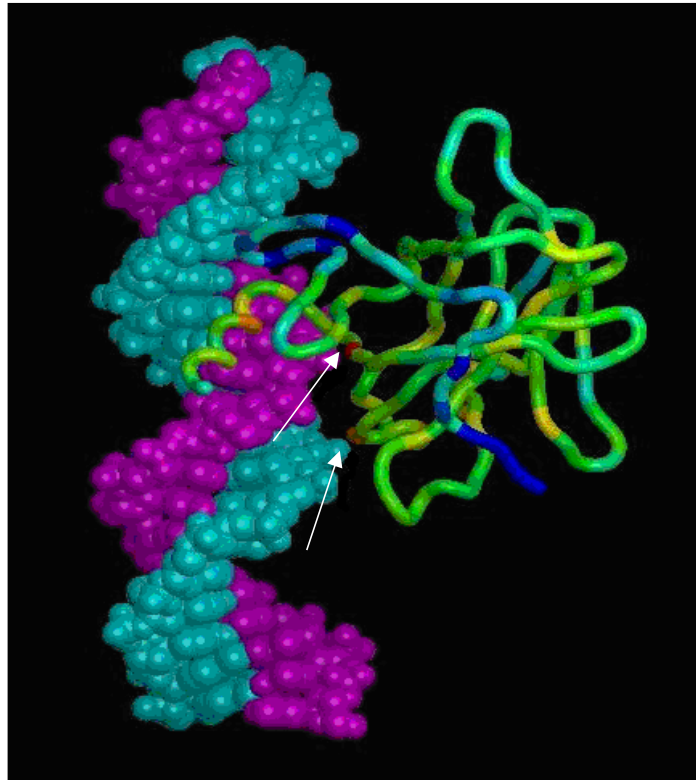


#### 4. ábra A P53 fehérje domén szerkezetének sematikus ábrázolása

A P53 N-terminális részén (NTD) tartalmaz egy transzaktivációs domént (TAD) és egy prolin gazdag régiót (PGR). Ezt követi a központi DNS-kötő domén (DKD), majd a C-terminális domén (CTD), melynek középső része, a tetramerizációs domén (TET), felelős a fehérje tetramer formájának kialakulásáért. A CTD-ben három nukleáris lokalizációs szignál (NLS) és egy nukleáris export szignál (NES) szekvencia található (3).

A P53 egy tumorszupresszor gén, melynek funkció-vesztékes mutációját a humán tumorok több, mint 50%-ában kimutatták (86). A mutációk 95%-a a P53 DNS-kötő doménjében található, melynek következtében a P53 szekvencia-specifikus transzaktivációs képessége megszűnik (76) (**5. ábra**). A meglehetősen rövid féléletidejű (20 perc) P53-mal ellentétben, mutáns változatának féléletideje hosszú (2-12 óra) (87-89). A P53 mutáns változata bizonyos tumorokban számos gén expresszióját indukálhatja, melyek a P53 normál működése esetén nem tartoznak célgénjei közé: *MDR* (Multiple drug resistance gene), *c-myc*, *PCNA* (Proliferating cell nuclear antigen), *IL-6* (Interleukin-6), *IGF-1* (Insulin-like growth factor 1), *FGF* (Fibroblast growth factor) és *EGFR* (Epidermal growth factor receptor) (90-96). Ezen kívül kimutatták, hogy a P53 részt vesz az ASNS (Asparagine synthetase) és a TERT (Telomerase reverse transcriptase) transzaktivációjában is (97). Következésképpen a P53 mutációja számos esetben eredményezi bizonyos növekedésben szerepet játszó gének és onkogének transzaktivációját, amivel ezáltal indukálódik a tumorosodás folyamatának előrehaladása (70).

A különböző DNS-t károsító ágenseken kívül még számos stresszfaktor is szerepet játszik a P53 aktiválásában: hipoxia, hősokk, hidegsokk, tápanyagforrás kimerülése, antioxidánsok, timidin dinukleotidok vagy a nukleotid készletben bekövetkező zavarok (98-103).



#### **5. ábra A P53 kötődése a DNS-hez**

Piros színnel azt a területet jelölték, amely mutációja meglehetősen gyakori, kézzel azt, ahol a tumorokban megfigyelhető mutáció gyakorisága ritka. A két leggyakrabban mutálódó rész nyíllal van jelölve (4).

### **2.4. A P53 szerepe a génexpresszió gátlásában**

A P53 transzkripció aktivációjában betöltött szerepén kívül részt vesz bizonyos gének expressziójának csökkentésében is. Ez utóbbi számos mechanizmuson keresztül megvalósulhat. A P53 közvetlenül aktiválhatja ko-represszorainak transzkripcióját azok promóterén lévő P53 válaszelemekhez kötődve. A HDAC1 (Histon deacetylase 1) kötődése specifikus promóter régiókhoz (mint pl. *Map4*, *P21*, *Stathmin*, *HSP-90-beta*, *Myc*

vagy *Nanog*) az mSIN3A-val alkotott P53-függő kölcsönhatásán keresztül is ilyen módon valósul meg (104-107). A P53 bizonyos gének represszióját speciális represszor fehérjék aktiválásán keresztül indukálja. Erre a leginkább tanulmányozott példa a *P21* P53-függő transzaktivációja, mely a retinoblasztóma (Rb) fehérje CDK-függő foszforilációját gátolja, hogy a sejtciklus G1/S fázisában az E2F transzkripció faktor által szabályozott géneket inaktív állapotban tartsa (108-112). Ezen kívül a P53 specifikus DNS szekvenciákhoz kapcsolódva gátolhatja más transzkripció aktivátorok hatását. Hipoxiás körülmények között a P53 az *AFP* (Alfa-fetoprotein) promóteréhez kötődve a HNF3 (Hepatocyte nuclear factor 3) transzkripció aktivátor elmozdításával gátolja az *AFP* expresszióját (113). Mindemellett a P53 fehérje-fehérje kölcsönhatások kialakításával eredményezheti olyan gének expressziójának csökkenését is, melyek nem közvetlen célgenjei. Erre tipikus példa a *Ciklin B2*, mely promóter régiójában nem tartalmaz P53 kötőhelyet, ugyanakkor rendelkezik NF-Y (Nuclear factor Y) szekvencia-specifikus kötőhellyel. Az NF-Y a *Ciklin B2* promóteréhez kötődve kölcsönhat a P53 fehérjével, aminek következtében a HDAC1 gátolja a *Ciklin B2* génről történő átíródást (114).

## **2.5. A P53 proteoszómális és proteoszóma-független bontása**

A P53 fehérje negatívan hat a sejtek proliferációjára, mert DNS károsodás következtében sejtciklus felfüggesztést, illetve apoptózist indukál (115-117). Ezért szükségesek az osztódó sejtekben olyan folyamatok, melyek a P53 működését valamennyire gátolják. Az alacsony P53 fehérje szint fenntartásáért elsősorban az MDM2 E3 ubiquitin ligáz felelős, ami a P53-hoz kötődő ubiquitin K48 lizin aminosavához poli-ubiquitin láncot kapcsol, ezáltal aktiválja a P53 proteoszómális lebontását (118). Ezen kívül a P53 a hozzá kötődő ubiquitin K63 lizin aminosaván keresztül is poli-ubiquitilálódik, ami a fehérje sejtmagból történő exportjához és ennek következtében a P53 citoplazmatikus felhalmozódásához vezet (119).

DNS károsodás hatására néhány DUB (Deubiquitinase) a P53 ubiquitilációjának és az azt követő degradációjának szabályozásában is részt vesz (120-122). Az USP24 (Ubiquitin specific peptidase 24) DUB elhasítja az ubiquitin és a P53 fehérje között lévő peptidkötést, amivel hozzájárul a P53 stabilitásának és aktivitásának fenntartásához. Az USP24 DNS károsodást követő aktivációja ATM-függő (Ataxia telangiectasia mutated) – az USP24 ATM kináz általi foszforilációja vezet a P53 fehérje UV sugárzás hatására bekövetkező stabilizálódásához (123).

A P53 ubiquitin-mediált 26S proteoszóma-függő lebontásán kívül nemrég leírtak egy másik útvonalat is, ahol a DEF fehérje (Digestive organ expansion factor) és egy sejtmagi cisztein proteáz, a Kalpain 3 vesz részt. Kimutatták, hogy a Kalpain 3 cisztein proteáz, komplexet képezve a DEF fehérjével, részt vesz a P53 lebontásában. Ezekből az eredményekből arra lehet következtetni, hogy a DEF egy „Scaffold” fehérjeként, a Kalpain 3 proteázzal alkotott kölcsönhatásán keresztül részt vesz a nukleáris P53 fehérje szint szabályozásában (124,125).

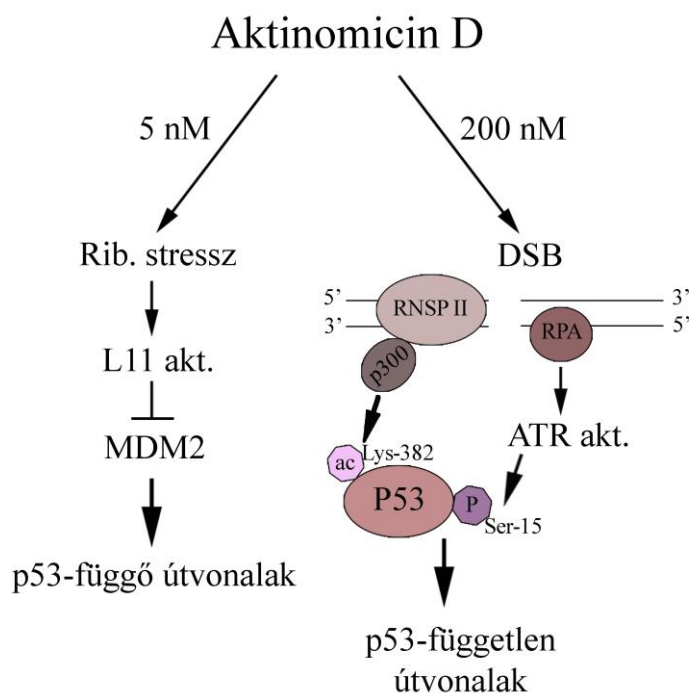
## **2.6. A P53 fehérje és a transzkripció blokk kapcsolata**

A P53 bizonyos aminosavain történő poszttranszlációs módosításai jelentős szerepet játszanak a fehérje sejtmagon belüli felhalmozódásában. Ezek a módosítások gyengítik a P53 és annak negatív regulátora, az MDM2 közti kölcsönhatást (126,127). A transzkripció elongáció gátlása esetén a P53 foszforilálódik szerin 15 aminosaván, valamint acetilálódik lizin 382 aminosaván, mely módosítások stabilizálják és aktiválják a P53 fehérjét (128). Ezzel ellentétben a transzkripció iniciációjának gátlása nincs hatással ezekre a módosításokra, ekkor a módosítatlan P53 fehérje szintje emelkedik a sejtmagban. Ebből következőleg, a P53 sejtmagon belüli felhalmozódása egy általános transzkripció blokk következménye lehet, amely valószínűleg független az MDM2 fehérjétől és a P53 fentebb említett poszttranszlációs módosításaitól (128).

DNS károsodást követően RPA (Replication protein A) és ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related) kötődik az egyes-szálú DNS-hez (129). Az ATR kináz egy lehetséges kapocs a P53 és a transzkripció leállása között, mivel a P53 S15P – ATR kináz általi – poszttranszlációs módosítása a DNS sérülések helyén figyelhető meg. Továbbá az S15P módosítás indukálja a p300/CBP (CREB-binding protein) kötődését a P53-hoz, ami fokozza a P53 transzaktivációs képességét (130) (**6. ábra**). A p300/CBP acetilálja a P53-at lizin 382 aminosaván, ami növeli a P53 szekvencia-specifikus DNS-kötését és a fehérje stabilizálódását is eredményezi (131,132). A P53 S15P és K382ac módosításainak megjelenése a sejtciklus leállításához, illetve apoptózishoz vezethet (130,133,134). A transzkripció blokk különböző módokon vezethet apoptózishoz: (I) felborul a túlélés és az apoptózist elősegítő faktorok aránya, (II) a P53 mitokondriális felhalmozódása következik be, (III) valamint a P53 sejtmagi feldúsulása figyelhető meg (135-137).

## 2.7. A P53, mint transzkripció elongációs faktor

A P53 korábbiakban részletezett funkcióin kívül szerepet játszik a transzkripció elongációs szakaszában is – kölcsönhat számos elongációs faktoral, mint például TFIIH-, ELL- (Eleven-Nineteen Lysine Rich Leukemia) és hPAF1C-vel (Human polymerase associated factor 1 complex) (138,139).



### 6. ábra Az AktD különböző biokémiai útvonalak aktivációjában játszik szerepet

Az AktD alacsony koncentrációban (5 nM) riboszómális stresszt indukál, melynek következtében riboszómális fehérjék (pl. L11) aktiválódnak. Az L11 gátolja az MDM2 ubiquitin ligázt, ezáltal P53-függő útvonalak indulnak el. Az AktD magas koncentrációban (200 nM) kettős-szálú DNS töréseket (DSB) indukálhat, mely egyrészt a p300 acetiltranszferáz RNSPII-höz való kötődését segíti elő, másrészt RPA fehérjék megjelenését eredményezi a DNS hibák helyén. Ezt követően a p300 acetilálja a P53 fehérjét 382-es lizinjén, míg az RPA fehérjék az ATR kinázt aktiválják, mely a P53 fehérjét S15 aminosavánál foszforilálja.

Ezen kívül a közelmúltban tett néhány megfigyelés arra utal, hogy a P53 transzkripció elongációs faktorként is képes működni azáltal, hogy az RNSPII-höz kötődve érzékeli a transzkripció elakadását. *Saccharomyces cerevisiae*-ben kimutatták, hogy a P53 számos

olyan gén kódoló és 3'UTR (3'untranslated region) régiójában jelen van, melyek nem közvetlen célgénjei (140). Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a P53 nemcsak specifikus DNS-szekvenciákhoz kötődve tudja az adott gén transzkripcióját szabályozni. Az élesztőben kifejeztetett humán P53 DNS-kötő doménjén keresztül kölcsönhat az élesztő RNSPII-vel, feltehetőleg annak S5P CTD-jével (141). Ezen kívül laboratóriumunkból származó korábbi adatok arra utalnak, hogy *Drosophilában* a P53 a politén kromoszómák transzkripciósan aktív régióiban figyelhető meg, valamint az RNSPII CTD defoszforilációja hatással van a DmP53 (*Drosophila melanogaster* P53) elhelyezkedésére (142).

Ezen megfigyelések alapján egy olyan modellt állítottunk fel, ami szerint a P53 együtt halad a transzkripciót végző RNSPII-vel és annak elakadása esetén szerepet játszik az RNSPII ubiquitin-függő proteosómális lebontásában. Dolgozatomban ennek a modellnek az igazolására szolgáló kísérletek eredményeit mutatom be.



### 3. Célkitűzések

**Fő célkitűzésünk volt,** hogy humán sejtekben vizsgáljuk a P53 jelenlétét olyan génszakaszokon, melyek transzkripcióját az RNSPII katalizálja. Célunk volt tanulmányozni, hogy milyen kapcsolat van a P53 és az elongáló RNSPII között, valamint hogy a P53 szerepet játszik-e a transzkripció elongációja során.

**Ennek megválaszolására az alábbiakat tűztük ki célul:**

**1. A P53 és az RNSPII globális fehérje szintjében bekövetkező változások, valamint a két fehérje ko-lokalizációjának vizsgálata alapállapotban és AktD kezelést követően. Annak tanulmányozása, hogy a P53, az S2P RPB1, illetve az S5P RPB1 ko-lokalizálódik-e a transzkripciós blokk következtében kialakuló DNS károsodás esetén megjelenő  $\gamma$ H2AX-szel.**

Célul tűztük ki a P53 és az RNSPII globális fehérje szintjének vizsgálatát 6 és 24 órával, 5 és 200 nM AktD kezelést követően. Tanulmányoztuk, hogy a két fehérje ko-lokalizációja hogyan változik AktD kezelés hatására, valamint hogy a P53 és az RNSPII ko-lokalizálódik-e a  $\gamma$ H2AX-szel a vizsgált fókuszokban. Ehhez immuncitokémiai eljárásokat alkalmaztunk kezeletlen és AktD-vel kezelt U2OS sejteken.

**2. A P53 fehérje jelenlétének vizsgálata transzkripciósan aktív génszakaszokon.**

Célunk volt humán sejtekben vizsgálni, hogy a P53 kötődése megfigyelhető-e olyan, az RNSPII általt átírt gének különböző régióin (promóter, géntest, 3'UTR), melyek nem tartalmaznak P53 konszenzus kötőhelyet. Ehhez korábban már publikált, kezeletlen U2OS sejteken végzett ChIP-seq adatok kiértékelését végeztük el. Ezt követően kromatin immunprecipitációs kísérleteket végeztünk annak kiderítésére, hogy a P53 kötődik-e a ChIP-seq adatok alapján általunk kiválasztott *ActB*, *Cdk12*, *Brat1* és *Sdcbp* gének promóter, géntest és 3'UTR régióihoz.

**3. A P53 és az RNSPII kötődése változik-e AktD-vel indukált transzkripció elongációs blokk hatására a vizsgált génszakaszokhoz.**

Céljaink között szerepelt, hogy vizsgáljuk, hogyan változik a P53 és az RNSPII kötődése a fentebb említett génszakaszokhoz transzkripció elongációs blokk során. Ennek kivitelezésére 200 nM AktD-vel kezeltünk U2OS sejteket, majd a kezelést követően 6 és

24 órás időpontokban gyűjtött mintákból kromatin immunprecipitációt végeztünk. Ezt követően tanulmányoztuk, hogy a kezeletlen mintákhoz képest megfigyelhető-e változás a P53 és az RNSPII eloszlásában az *ActB*, a *Cdk12*, a *Brat1* és az *Sdcbp* gének promóter, géntest és 3'UTR régióiban.

#### **4. A humán P53 és az RNSPII közti kölcsönhatás vizsgálata stresszmentes körülmények között és AktD-vel indukált transzkripció elongációs blokkot követően.**

Célunk volt egy emlős modellrendszer előállítása, ahol vizsgáltuk az RPB1, az S5P RPB1 (transzkripció iniciációs forma), illetve az S2P RPB1 (transzkripció elongációs forma) és a P53 közti kölcsönhatást. Vizsgálni kívántuk, hogy a P53 és az RNSPII közti kölcsönhatás változik-e akkor, ha a transzkripció elongációs szakaszát AktD-vel blokkoljuk. Ehhez ko-immunprecipitációs kísérleteket végeztünk AktD-vel kezelt, valamint kezeletlen sejtekből izolált fehérje mintákon.

#### **5. A P53 szerepet játszik-e a transzkripció elongációs blokk következtében megfigyelhető S2P RPB1 ubiquitilációjának szabályozásában.**

Célunk volt tanulmányozni, hogy befolyásolja-e a P53 fehérje jelenléte az S2P RPB1 ubiquitilációját magas koncentrációjú AktD kezelést követően 6 és 24 órával. Ehhez Western blot segítségével kimutattuk, hogyan változik a ubiquitilált S2P RPB1 mennyisége transzkripció blokk során P53 jelenlétében, illetve annak hiányában.

#### **6. Célunk volt vizsgálni, hogy az S2P RPB1 AktD hatására bekövetkező ubiquitilációja hatással van-e az RNSPII fehérje mennyiségére, és a fehérje szintbeli változások proteozómális degradáció következményei-e.**

Célunk volt tanulmányozni, hogy a transzkripció elongációs blokk során bekövetkező RPB1 ubiquitiláció és a megfigyelt fehérje szintbeli változások összefüggésben vannak-e az RPB1 proteozómális degradációjával. Ehhez a 26S proteozóma funkcióját gátoltuk, majd megfigyeltük az RPB1, illetve annak transzkripciósan aktív formáinak fehérje szintjében AktD kezelés hatására bekövetkező változásait.

## **4. Anyagok és módszerek**

### **4.1. U2OS sejtek fenntartása**

A U2OS sejtekben vad típusú *P53* expresszáldódik, ezért ezt a sejtvonalat alkalmaztuk kísérleteinkhez. U2OS sejteket 10% FCS-t (Fetal Calf Serum) (Lonza), 1x antibiotikumot és 4 mM glutamint tartalmazó DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Lonza) tápoldatban növesztettünk 37 °C-on, CO<sub>2</sub>-os inkubátorban.

### **4.2. U2OS sejtek viabilitásának mérése tripán kék festéssel**

A tripszines kezelést követően a U2OS sejtszuszpenziót 1:1 arányban DMEM médiummal hígítottuk. Ehhez 1:1 arányban 0,4%-os tripán kék oldatot adtunk, majd 10-15 percig inkubáltuk. Ezt követően Bürker kamrával számoltuk az élő- és elpusztult sejtek arányát.

### **4.3. U2OS sejtek kezelése AktD-vel, MG132-vel, valamint Calpain V inhibitorral**

A sejteket 5-200 nM AktD-vel (Sigma-Aldrich) kezeltük, majd 6, illetve 24 óráig inkubáltuk 37 °C-on. Az MG132 (Tocris Bioscience) proteaszóma inhibitor (20 µM) vagy Calpain inhibitor V-t (Calbiochem) (2-10 µM) 1 órával az AktD kezelés előtt mértük hozzá a sejtekhez.

### **4.4. Immuncitokémia**

U2OS sejteket osztottunk ( $3 \times 10^5$ /lyuk) 6 lyukú plate-be, melybe fedőlemezt helyeztünk, majd különböző koncentrációjú AktD-vel kezeltük őket. A sejteket PBS-sel mostuk, majd 25 percig fixáltuk 4%-os formaldehid/PBS oldatban. Ezt követően a sejteket háromszor mostuk PBS-sel, majd 20 percig permeabilizáltuk 0,3% Triton-X-100/PBS oldatban. PBS-es mosást követően az aspecifikus fehérjekötő helyeket 20 percig blokkoltuk 5% BSA/PBST oldatban (PBST 0,1% Tween 20-at tartalmazott). PBS-es mosást követően a sejteket elsődleges antitesttel (1% BSA/PBST-ben volt hígítva) 1,5 órán át inkubáltuk. Háromszori PBS-es mosást követően a sejteket 1 órán át 1% BSA-PBST-ben hígított fluorofórral konjugált másodlagos antitesttel inkubáltuk. Az immuncitokémia során alkalmazott ellenanyagok listáját az **1. táblázat** mutatja. Háromszori PBS-es mosást követően ProLong Gold mounting médium-ot (Life Technologies) cseppentettünk a

tárgylemezre, melyre ráhelyeztük az immunfestett sejteket tartalmazó fedőlemezeket. A mintákat Nikon eclipse 80i fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk és ugyanazt az expozíciós időt alkalmaztuk minden egyes kezelés esetében. A fluoreszcencia intenzitását Fiji (Image J) szoftverrel értékeltük ki.

#### **4.5. CSK immuncitokémia**

U2OS sejteket PBS-el mostuk, majd kétszer 3 percig CSK pufferrel (10 mM HEPES pH 7,0 (Sigma-Aldrich), 100 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 300 mM szacharóz (Molar Chemicals), 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Molar Chemicals), 0,7% Triton-X-100 (Fluka) és 0,3 mg/ml RNáz A (Sigma-Aldrich)) inkubáltuk. Ezt követően a sejteket kétszer mostuk PBS-el, majd 10 percig 4% formaldehid oldattal fixáltuk (Sigma-Aldrich). PBS-es mosást követően a sejteket 5 percig permeabilizáltuk 0,2% Triton-X-100-at (Fluka) tartalmazó PBS oldatban. Ezután 20 percig 5% BSA-t tartalmazó PBST-ben (0,1% Tween 20 (Molar Chemicals)) inkubáltuk a mintákat az aspecifikus festődés elkerülése érdekében. PBST-vel történő mosásokat követően elsődleges antitestekkel 1,5 órán át, majd megfelelő fluorofórral konjugált másodlagos antitestekkel 50 percig inkubáltuk a mintákat. A CSK immunfestésben használt ellenanyagok listáját az **1. táblázat** mutatja. PBST-vel történő mosást követően a mintákra DAPI-t tartalmazó ProLong Gold Antifade reagenst (Life Technologies) cseppentettünk, fedőlemezt helyeztünk rá, majd a mintákat Olympus FluoView FV1000 konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk. A mintáknál ugyanazt az expozíciós időt alkalmaztuk minden egyes kezelés esetében. A fluoreszcencia intenzitását Fiji (Image J) szoftverrel értékeltük ki.

#### **4.6. Western blot**

U2OS sejteket lízis pufferben (150 mM NaCl, 1% Triton-X-100, 50 mM Tris-HCl pH 8.0) (Sigma-Aldrich) tártuk fel, jégen inkubáltuk 1 órán át, majd centrifugálással (13000 rpm, 5 perc, 4 °C) kiülepítettük a sejtörmeléket. A fehérje koncentráció lemerése után 20 µg fehérjét a megfelelő térfogatú β-merkaptóetanolt tartalmazó 2x SDS-loading pufferben 100 °C-on 5-10 percig forraltuk. Ezt követően a fehérjéket 6, illetve 8%-os (a várt fehérje méretétől függően) poliakrilamid gélelektroforézissel elválasztottuk, majd nitrocellulóz membránra rögzítettük. Ezután a membrán szabad fehérjekötő helyeit 5% tejpor- TBST-ben éjszakán át blokkoltuk. Másnap háromszor 10 percig 1x TBST-vel történő mosást követően 1,5 órán át inkubáltuk elsődleges ellenanyaggal, melyet 1% tejpor- TBST-ben

hígítottunk. Ezután ismét háromszor 10 percig 1x TBST-vel történő mosást követően 50 percig torma-peroxidázzal konjugált másodlagos ellenanyaggal inkubáltuk. A Western blot során alkalmazott ellenanyagok listáját a **2. táblázat** mutatja. Ezután a membránra ECL előhívó reagenst (Millipore) mértünk, és a kemilumineszcens jelet C-DIGIT blot scanner-rel (LI-COR) mutattuk ki. Minden egyes mintasorozat esetében, a jel intenzitását Fiji (Image J) szoftverrel értékeltük ki.

#### **4.7. ChIP-seq analízis**

A European Nucleotide Archive-ből (<http://www.ebi.ac.uk/ena>) letöltött, korábban már publikált adatok alapján készült: P53 és az ehhez tartozó input fájlok (srr847010, srr847017), S2P RPB1 (srr987275), S5P RPB1 (srr987273) és totál RPB1 (srr987271). Az összes letöltött adat U2OS sejtvonalon végzett kísérletekből származik. A referencia humán genom és az annotált gének listáját a UCSC Genom Browser-ről ([www.ucsc.org](http://www.ucsc.org)), Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) töltöttük le. ChIP-seq tag eloszlási értékek minden refseq gén esetében az annotált géntestről, illetve innentől +/- 1500 bp-ra upstream vagy downstream származnak, melyeket a seqMINER program segítségével nyertünk ki (143). A ChIP-seq tag-ek átlagos génprofilját és a különböző kötődési mintázatát Anamika és mtsai 2012 cikke alapján azonosítottuk (144).

#### **4.8. Kromatin immunprecipitáció (ChIP)**

##### **4.8.1. Kromatin preparálás**

10 cm átmérőjű csészében növesztett U2OS sejteket PBS-es mosást követően 1%-os formaldehid oldattal 20 percig fixáltuk, majd a fixálást 125 mM koncentrációjú glicin oldattal állítottuk le (5 perc). Ezután háromszor mostuk PBS-sel, majd centrifugálással (1500 rpm, 5 perc, 4 °C) összegyűjtöttük a sejteket. Ezt követően a sejtüledéket sejt lízis pufferben (5 mM PIPES pH 8,0, 85 mM KCl, 0,5% NP-40, 1x PIC) szuszpendáltuk fel, majd 10 percig jégen inkubáltuk. Centrifugálást (2000 rpm, 5 perc, 4 °C) követően a csapadékot hideg sejtmag lízis pufferben (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,8% SDS, 1x PIC) felszuszpendáltuk. A kromatint 4x 20 mp ON/1 perc OFF beállítással Diagenode szonikátorral fragmentáltuk. A szonikálást követően a kromatinhoz hígító puffert (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EGTA pH 8,0, 1% Triton-X-100, 140 mM NaCl, 1x PIC) adtunk.

A szonikálást követően megszüntettük a keresztkötést és a szonikált kromatinhoz RNáz-t adtunk, 15 percig 37 °C-on aktiváltuk az enzimet, majd éjszakán át 65 °C-on inkubáltuk. Másnap 500 µg/ml proteináz K-t és 0,5% SDS-t adtunk a mintákhoz, majd 2 órán át, 50 °C-on inkubáltuk. Ezt követően hozzáadtunk egy térfogategység fenol-kloroform-izoamilalkoholt és centrifugálást (13000 g, 15 perc, 4 °C) követően a vizes fázist új Eppendorf csőbe mértük. Hozzáadtunk 1/10 térfogat Na-acetátot, 2,5 térfogat 96%-os etanolt és 100 µg/ml glikogént, összekeverés után 2 órára -20 °C-ra helyeztük. Centrifugálás (13000 g, 15 perc, 4 °C) és a felülúszó eltávolítása után a csapadékot 70%-os etanollal mostuk. Centrifugálást követően (13000 g, 15 perc, 4 °C) a csapadékot megszárítottuk, majd TE pufferben (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) felszuszpendáltuk. 0,8%-os agaróz gélen futtattuk a mintákat a szonikálás sikerességének ellenőrzése érdekében.

#### 4.8.2. Immunprecipitáció és keresztkötés megszüntetése

##### 4.8.2.1. Kromatin előtisztítása

A 30 µg kromatint azzal megegyező térfogatú RIPA pufferrel (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0, 1% Triton-X-100, 0,1% Na-DOC, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 1x PIC), valamint 4 µl/minta mágneses gyönggyel (Dynabeads) 2 órán keresztül 4 °C-on inkubáltuk.

##### 4.8.2.2. Immunprecipitáció

A felülúszóhoz megfelelő mennyiségű ellenanyagot adtunk és a mintákat éjszakán át 4 °C-on forgatva inkubáltuk. Az ellenanyag nélküli kontrollt („no antibody control” = NAC) hasonló módon kezeltük. Másnap minden egyes mintához 40 µl mágneses gyöngyöt mértünk, majd éjszakán át 4 °C-on forgatva inkubáltuk.

##### 4.8.2.3. Mosás, eluálás és DNS kicsapás

Az összegyűjtött gyöngyöket először alacsony sókoncentrációjú pufferrel (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8,0, 1% Triton-X-100, 0,1% SDS, 1x PIC), majd magas sókoncentrációjú pufferrel (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8,0, 1% Triton-X-100, 0,1% SDS, 1x PIC), illetve LiCl pufferrel (250 mM LiCl, 1% NP-40, 1% Na-DOC, 1 mM EDTA (pH 8,0), 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1x PIC) 4 °C-

on 10 percig mostuk. Ezt követően a gyöngyöket 10 percig 4 °C-on TE pufferrel mostuk. Ezután 200 µl elúciós puffert (1% SDS, 100 mM NaHCO<sub>3</sub>) mértünk a gyöngyökhöz, majd 15 percig 65 °C-on inkubáltuk. Ezután 200 mM NaCl-ot adtunk a mintákhoz és 6 órán át 65 °C-on inkubáltuk. Végül mindegyik mintához 2,5 térfogategységnyi 96%-os etanolt mértünk, majd éjszakán át -80 °C-on tároltuk. A DNS-t centrifugálással összegyűjtöttük és 50 µl TE pufferben feloldottuk. Végül qPCR segítségével vizsgáltuk a DNS-fehérje kölcsönhatásokat. A qPCR során alkalmazott primerek szekvenciái a **3. táblázatban** vannak feltüntetve. Az ábrázolt diagramok három független kísérlet, ezen belül két-két qPCR mérés eredményei. A TIC% a mérésekből számolt átlagot mutatja minden egyes minta esetében. Az oszlopokon lévő hibaszávok a standard devianciának felelnek meg.

## 4.9. Ko-immunprecipitáció

### 4.9.1. Sejtek feltárása

U2OS sejteket PBS-es mosást követően centrifugálással (6000 rpm 5 perc, 4 °C) összegyűjtöttük, majd nem denaturáló lízis pufferben (150 mM NaCl, 1% Triton-X-100, 50 mM Tris-HCl pH 8,0) feltártuk a sejteket. Ezt követően centrifugálással (6000 rpm, 5 perc, 4 °C) eltávolítottuk a sejttörmeléket, majd a felülúszóban lévő fehérjék koncentrációját Bradford reagenssel mértük le.

### 4.9.2. Protein A/Sepharose gyöngyök duzzasztása

A gyöngyöket 25 °C-on 1 órán át PBS-ben duzzasztottuk. 2x 10 percig PBS-sel szobahőmérsékleten forgatva, majd újabb 2x 10 percig nem denaturáló lízis pufferrel 4 °C-on forgatva mostuk a gyöngyöket és a mosások között centrifugálással (1000 rpm, 1 perc, 4 °C) gyűjtöttük össze azokat. A nem specifikus kötőhelyek blokkolása miatt a gyöngyök térfogatával megegyező térfogatú nem denaturáló lízis puffert, valamint egyes-szálú DNS-t (1 µg/µl) és BSA-t (2 mg/ml) adtunk a gyöngyökhöz és éjszakán át 4 °C-on forgatva inkubáltuk. Másnap centrifugálást (1000 rpm, 1 perc, 4 °C) követően a gyöngyöket 3x 10 percig nem denaturáló lízis pufferrel, 4 °C-on forgatva mostuk, majd a mintákat centrifugálással összegyűjtöttük (1000 rpm, 1 perc, 4 °C). Végül a gyöngyöket nem denaturáló lízis pufferben vettük fel 1:1 arányban.

#### 4.9.3. Előtisztítási lépés

A felülúszóhoz 15 µl protein A/Sepharose gyöngyöt adtunk, majd 2 órán át forgatva inkubáltuk 4 °C-on, végül a gyöngyöket centrifugálással eltávolítottuk (1000 rpm, 10 perc, 4 °C).

#### 4.9.4. Immunprecipitáció

A fehérje mintákhoz a megfelelő mennyiségű antitestet adtuk, majd éjszakán át 4 °C-on kevertettük. Másnap 40 µl protein A/Sepharose gyöngyöt adtunk a mintákhoz, majd éjszakán át, 4 °C-on kevertettük. Másnap a gyöngyöket centrifugálással összegyűjtöttük (1000 rpm, 5 perc, 4 °C) és négyszer mostuk nem denaturáló lízis pufferrel. A gyöngyökhöz 2x SDS loading puffert adtunk, majd 100 °C-on forraltuk 5 percig. Centrifugálást (6000 rpm, 5 perc, 4 °C) követően a gyöngyöket eltávolítottuk, a fehérje komplexeket tartalmazó felülúszó felhasználásával a kölcsönhatásokat Western blot segítségével vizsgáltuk.

#### 4.10. U2OS sejtek transzfekciója siRNS-sel

A P53 gén csendesítésére U2OS sejtekben P53 siRNS pool-t (L-003329-00-0005), illetve negatív kontrollként ún. „non-targeting” siRNS pool-t (D-001810-10-05) alkalmaztunk. 6 lyukú plate esetében 5 µM siRNS-sel transzfectáltunk  $3 \times 10^5$  U2OS sejtet INERFERin (Polyplus) transzfekciós reagenssel, majd a sejteket 48 óráig 37 °C-os CO<sub>2</sub> inkubátorban tároltuk antibiotikumot nem tartalmazó DMEM médiumban.

#### 4.11. Poli-ubiquitilált fehérje pull-down

U2OS sejteket PIC-el (Roche), deubiquitináz inhibitorral (DUBi) (Life sensors) és PhosSTOP-al (Roche) kiegészített hideg TENT pufferben (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Triton-X-100) szonikálással tártuk fel. A mintákat centrifugálással összegyűjtöttük (14000 g, 10 perc, 4 °C), majd a felülúszó fehérje koncentrációját Bradford reagenssel mértük meg. 1 mg fehérjét mértünk 20 µl Agaróz-TUBE2 (UM402) (Life sensors) gyöngyhöz, majd 2 órán át 4 °C-on forgatva inkubáltuk. Ezt követően a gyöngyöket háromszor mostuk PIC-el (Roche), deubiquitináz inhibitorral (DUBi) (Life sensors) és PhosSTOP-al (Roche) kiegészített TBST (20 mM Tris-HCl pH



8.0, 150 mM NaCl, 0,1% Tween-20) pufferrel. Végül a poli-ubiquitilált fehérjéket 4x SDS loading pufferrel eluáltuk 100 °C-on 10 percig.

#### **4.12. Propídium-jodid festés**

U2OS sejteket centrifugálással (6000 rpm, 5 perc, 4 °C) összegyűjtöttük, PBS-sel mostuk, majd centrifugálással újra összegyűjtöttük (6000 rpm, 5 perc, 4 °C), végül a csapadékot 15 percig inkubáltuk jégen. Ezt követően 70%-os etanolt csepegtettünk hozzá, miközben lassan vortexeltük a sejteket. Az etanolt centrifugálással (6000 rpm, 5 perc, 4 °C) eltávolítottuk, majd PBS-es mosást követően 100 µg/ml RNase oldatban felfuszpendáltuk és 30 percig 37 °C-on inkubáltuk. Ezután 40 µg/ml PBS-ben oldott propídium-jodidot adtunk a mintákhoz, majd 4 °C-on tároltuk 30 percig. Ezt követően FACS analízist végeztünk.

Elsődleges antitestek		Másodlagos antitestek	
Típus	Hígítás	Típus	Hígítás
<b>P53</b> (Dako IS616)	100x	GAM Alexa 488 (Molecular Probes A11029)	300x
<b>γH2AX</b> (Abcam ab2893)	500x	GAR DyLight 550 (Abcam ab96984)	2000x
<b>γH2AX</b> (Millipore 05-636-I)	100x	GAM Alexa 488 (Molecular Probes A11029)	200x
<b>N-20 RNAPII</b> (Santa Cruz sc899)	200x	GAR DyLight 550 (Abcam ab96984)	400x
<b>S2P CTD</b> (Abcam ab5095)	500x	GAR DyLight 550 (Abcam ab96984)	1000x
<b>S5P CTD</b> (Abcam ab5131)	500x	GAR DyLight 550 (Abcam ab96984)	1000x

**Táblázat 1.** Az immuncitokémia és a CSK immunfestés során alkalmazott antitestek

Elsődleges antitestek		Másodlagos antitestek	
Típus	Hígítás	Típus	Hígítás
<b>P53</b> (Dako IS616)	2500x	RAM-HRP (Dako P0260)	5000x
<b>S15P P53</b> (Cell signalling 9284)	500x	GAR-HRP (Dako P0448)	5000x
<b>7G5 RNAPII</b> (Prof. Tora L. lab.)	5000x	RAM-HRP (Dako P0260)	10000x
<b>S2P CTD</b> (Abcam ab5095)	1000x	GAR-HRP (Dako P0448)	2000x
<b>S5P CTD</b> (Abcam ab5131)	2000x	GAR-HRP (Dako P0448)	4000x
<b>GAPDH</b> (Millipore, MAB374)	2500x	RAM-HRP (Dako P0260)	5000x

**Táblázat 2.** A Western blot során alkalmazott antitestek

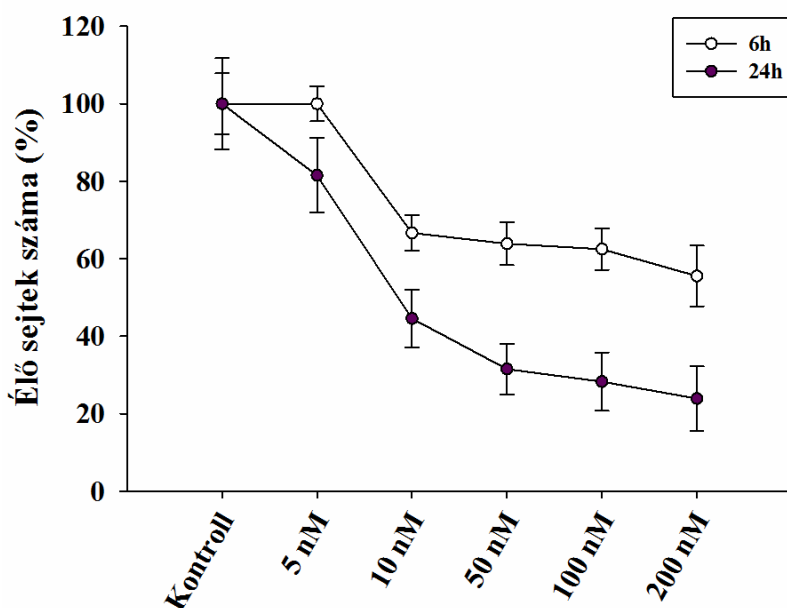
Gén szakasz	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>ActB</i> promóter	CGCCAAAACTCTCCCTCCTC	CCGCTGGGTTTTATAGGGCG
<i>ActB</i> géntest 1.	CTTTCTCTGCACAGGAGCCT	AGGTGTGGTGCCAGATTTTC
<i>ActB</i> géntest 2.	GTGAGGACCCTGGATGTGAC	GCAAAGACCTGTACGCCAAC
<i>ActB</i> 3'UTR	CACACAGGGGAGGTGATAGC	ACATCTCAAGTTGGGGGACA
<i>Cdk12</i> promóter	GGAGCCTGGGAGTGTTTGTT	CGCTTTTACCTCATTCCCCT
<i>Cdk12</i> géntest 1.	CCCCAGGTGAGCTATTTGTC	CAACTGAAGACCCCACT
<i>Cdk12</i> géntest 2.	GCAGTGAGCCGAGATTGAGT	GCCTGGAGGTTGAGGATGTA
<i>Cdk12</i> 3'UTR	ACATCCCAGCATGTGTACCC	CCTCCAAATTATCCCATCC
<i>Brat1</i> promóter	GTGGGGAAGTGAAGTGCAC	CTCGGCATGAACCACTAGG
<i>Brat1</i> géntest 1.	CTCCTAATGTCCCCAGCAAG	AGGCCCTCAGTATCTGCTC
<i>Brat1</i> géntest 2.	CGAGCCAGCTACTCTCATCC	ACTCACCTCGCGTTTGTCTC
<i>Brat1</i> 3'UTR	CTGTGGGATTTCTTGACCTTG	CAGCACCATGTCTTCTGTG
<i>Sdcbp</i> promóter	AGGAGTTGAGAAGGGGTCGT	GTCGCCTCCAATTCAAAGAG
<i>Sdcbp</i> géntest 1.	TTTGCCAGTGTTTCCTACTTCA	TTTCCCATTGTCCCTCAAC
<i>Sdcbp</i> géntest 2.	TGGTTTTGTCAGCAGTTGGT	GCCTGAGTCCAATTTTCCA
<i>Sdcbp</i> 3'UTR	CCCCTTTTGTTTCAATTTGTGG	GCAAGGAGGAGTCAGGAAAA
<i>P21</i> promóter*	CCGAAGTCAGTTCCTTGTGG	CGCTCTCTCACCTCCTCTGA
Intergenikus régió*	TGGAACCTTCTGGAAGACACTG	TACACCACTCAAGGGAACTG

**Táblázat 3.** A kromatin immunprecipitációt követő qPCR-hoz alkalmazott genomi primerek szekvenciája \*(145)

## 5. Eredmények

### 5.1. Az aktinomicin D koncentrációtól függően befolyásolja a U2OS sejtek túlélését

Az AktD az egyik legismertebb kemoterápiás szer, amivel hatékonyan lehet a transzkripció elongációs szakaszát blokkolni, ezért kísérleti elrendezésünkben ezt alkalmaztuk (146,147). Korábbi adatokból már ismert, hogy az AktD különböző koncentrációban eltérő biokémiai útvonalakra hat. Alacsony koncentrációban riboszómális stresszt indukálva P53-függő, míg magas koncentrációban P53-független útvonalakat aktivál (62). Azonban nem álltak rendelkezésünkre adatok a kemoterápiás szer toxicitásáról az általunk használt U2OS sejtvonalon. Kísérletünkben tripán kék festéssel vizsgáltuk, hogy az AktD 5-200 nM koncentrációban mennyire toxikus a U2OS sejtekre 6 és 24 órával a kezelést követően (7. ábra).



#### 7. ábra Az AktD különbözőképpen befolyásolja a U2OS sejtek túlélését

U2OS sejteket 5, 10, 50, 100 és 200 nM AktD-val kezeltünk, majd tripán kék festés segítségével vizsgáltuk a sejtek túlélését 6 és 24 órát követően.

Eredményeink azt mutatják, hogy az 5 nM-os kezelés 6 óra után nem befolyásolta a sejtek túlélését, azonban 24 órát követően a sejtek 82%-a maradt életben. A 200 nM-os kezelést 6 óra után a sejtek 55%-a, míg 24 óra elteltével a sejtek 24%-a élte túl. Ezek alapján

elmondható, hogy az AktD 5 nM koncentrációban 6 óra elteltével még nem befolyásolja a sejtek túlélését, viszont 24 óra után a sejtek 80%-a élte túl a kezelést. Ezzel ellentétben a 200 nM koncentráció 6 óra után féltálas, míg 24 órát követően már nagy mennyiségű sejtpusztulást okoz. További kísérleti elrendezésünkben alacsony (5 nM) és magas (200 nM) koncentrációban alkalmaztuk a szert annak érdekében, hogy két különböző útvonalra hatva vizsgáljuk a P53 és az RNSPII kapcsolatát. Azért választottuk az 5 nM-os koncentrációt, mert az ettől magasabb dózisok már nem csak riboszómális stresszt indukálva hatnak. A másik koncentráció, melyet későbbi kísérleteinkben alkalmaztunk, a 200 nM volt, melyet a sejtek még túlélnek, de kellően magas koncentráció ahhoz, hogy transzkripció elongációs blokkot aktiváljon.

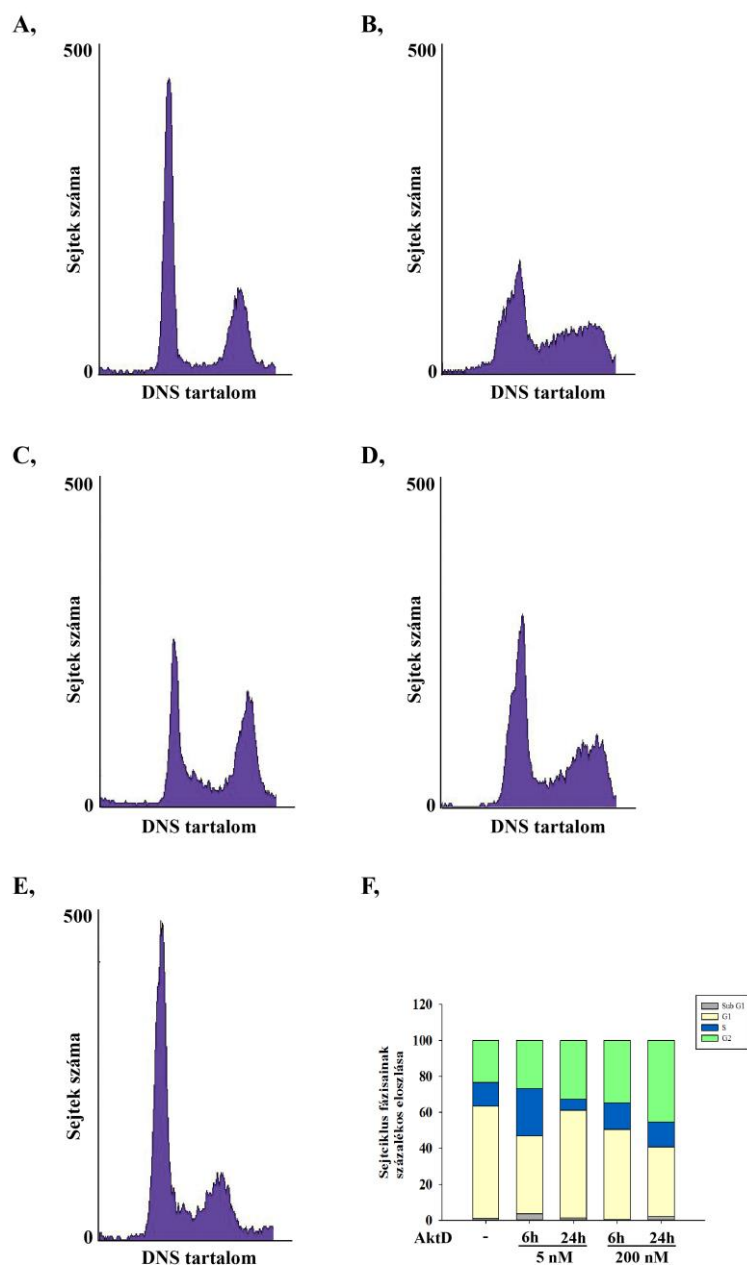
## **5.2. Az aktinomicin D kezelés a sejtciklus fázisainak eltolódását okozza**

Annak tisztázására, hogy az AktD kiváltotta sejtpusztulás elsődlegesen az apoptotikus utak aktivációja miatt következik-e be, propídium-jodid festést alkalmaztunk, majd FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) analízissel vizsgáltuk a Sub-G1 fázisban lévő sejtek százalékos arányát 6 és 24 órával, 5 és 200 nM AktD kezelést követően (**8. ábra**). Az apoptotizáló sejtekben lévő nukleoszómális DNS fragmentálódik, ami a lúgos pH-jú puffer hozzáadását követően a sejtekből könnyen kiszabadul. Az apoptotizáló sejtek tehát kevesebb DNS tartalmuk miatt kevésbé festődnek propídium-jodiddal és ellentétben a normál, G1 fázisban lévő sejtekkel, kisebb fluoreszcenciát mutatnak a mérés során, aminek következtében a G1 fázis előtti, úgynevezett Sub-G1 fázisban mérhetőek (148). AktD kezelés hatására a Sub-G1 fázisban nem figyelhetünk meg számottevő változást a kezletlen kontrollhoz képest.

Kimutattuk, hogy AktD hatására a sejtciklus fázisainak százalékos arányában megfigyelhető bizonyos mértékű eltolódás (**8. ábra**). AktD kezelést követően a G1 fázisban lévő sejtek száma kevesebb, míg a G2 fázisban több. Az S fázisban lévő sejtek száma nem változott magas koncentrációjú AktD kezelés hatására. Ezzel ellentétben 5 nM AktD hatására 6 óra után több, 24 órát követően pedig kevesebb S fázisban lévő sejtet mutattunk ki.

Eredményeink azt mutatják, hogy az AktD sem alacsony, sem pedig magas koncentrációban nem vezet apoptózishoz. Ezen kívül kísérletünkéből kiderül, hogy U2OS sejtekben az AktD a sejtciklus fázisainak eltolódását okozza, feltehetőleg a P53 aktiválásán keresztül. A G1 fázisú sejtek számának csökkenése valószínűleg a sejtciklus

G2 fázisában történő leállás következménye, ahol lényegesen több sejtet számoltunk. Az alacsony dózisú AktD hatására 24 óránál megfigyelhető csökkenés az S fázisú sejtek esetében összefüggésbe hozhatók a sejtciklus G1 fázisában történő leállással.



# **8. ábra Az AktD kis mértékben befolyásolja a sejtciklus fázisainak arányát U2OS sejtekben**

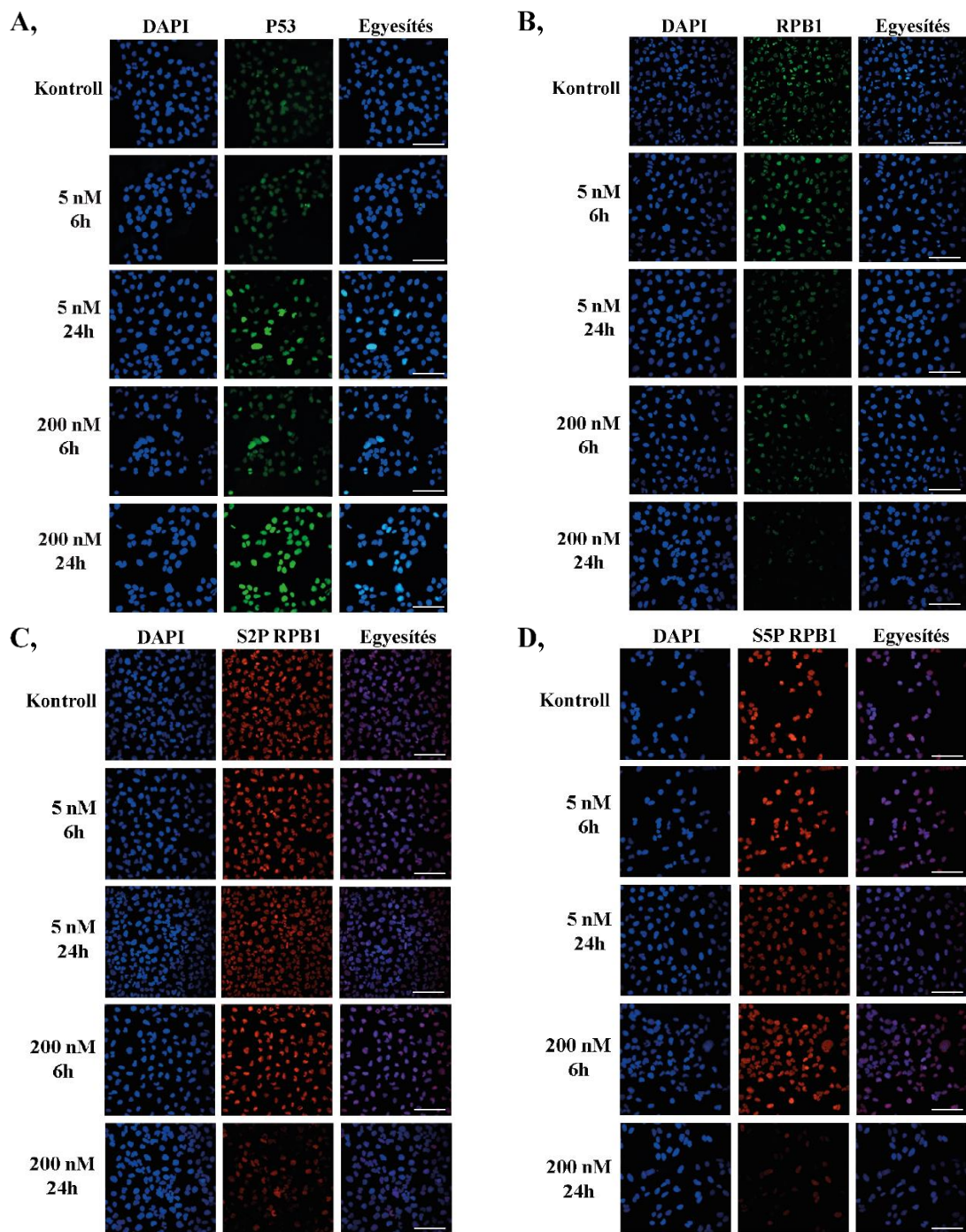
U2OS sejtek sejtciklusának FACS-al történő vizsgálata, 6 és 24 órával, 5 és 200 nM AktD kezelést követően. **A-E**, A FACS analízissel mért DNS mennyiség ábrázolása a sejtek számának függvényében. **F**, Az AktD kezelés hatása a sejtciklus fázisainak (Sub-G1, G1, S, G2) százalékos eloszlására oszlop diagramon ábrázolva.

### 5.3. A P53 és az RPB1 összfehérje szintje ellentétesen változik AktD kezelés hatására

Bár az AktD más-más útvonalakat aktivál a koncentrációjától függően, a P53 fehérje mindkét útvonalban szerepet játszik. A következő kísérletekben immuncitokémiával vizsgáltuk, hogy U2OS sejtekben miként változik a P53 és az RPB1 fehérje szintje alacsony, illetve magas koncentrációjú AktD kezelést követően. Továbbá tanulmányoztuk, hogy az AktD-nek milyen hatása van a két fehérje sejten belüli elhelyezkedésére. Végül megvizsgáltuk, hogyan változik az RPB1 CTD szerin 5 (S5P RPB1) és szerin 2 aminosavakon foszforilált (S2P RPB1) formáinak szintje a kezelés hatására.

24 órás 5 nM, valamint 6 órás 200 nM AktD kezelést követően nem tapasztaltunk jelentős változást az RPB1 fehérje szintjében, mely 24 órás 200 nM kezelést követően felére csökkent a kontrollhoz viszonyítva (**9. B ábra, 12. B ábra**). Az S2P RPB1 szintje 24 órával 200 nM AktD kezelés után felére (**9. C ábra, 12. C ábra**), míg az S5P RPB1 szintje 24 órával 5 nM AktD hatására kis mértékben csökkent, azonban ugyanebben az időpontban, 200 nM AktD kezelést követően az ötödére esett vissza (**9. D ábra, 12. D ábra**). Érdekes megfigyelés volt, hogy 24 órával 200 nM AktD kezelés után bekövetkező S2P RPB1 és S5P RPB1 fehérje szint csökkenés ellenére az RPB1 transzkripciósan aktív formái egyedi sejtmagi fókuszokban láthatóak (**10-11. ábra**). A P53 fehérje szintje 6 óra után 1,5-szeres, míg 24 óra elteltével 3,5-szeres emelkedést mutatott mind 5 nM, mind pedig 200 nM AktD kezelést követően (**9. A ábra, 12. A ábra**). A P53 a sejtmagban, az RPB1 pedig a nukleoplazmában található a kezeléstől függetlenül, tehát sejten belüli elhelyezkedésük nem változik. Az immuncitokémia kiértékelése a **12. ábrán** látható.

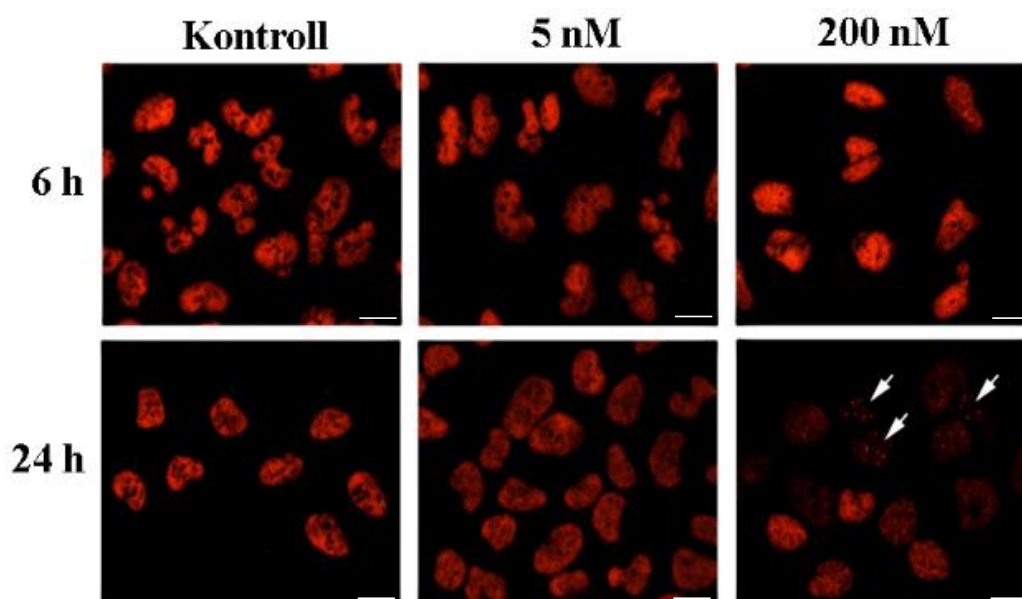
Eredményeink szerint az RPB1 szintjében 24 órával AktD kezelést követően jelentős csökkenés tapasztalható, az RPB1 S2P és S5P formái egyedi sejtmagi fókuszokban figyelhetők meg 24 órával magas dózisú AktD kezelést követően. Ezzel ellentétben a P53 fehérje szintjében nagy mértékű emelkedés következett be AktD kezelés hatására.



**9. ábra A P53 globális fehérje szintje nő, míg az RPB1, az S2P RPB1 és az S5P RPB1 szintje csökken AktD kezelés hatására**

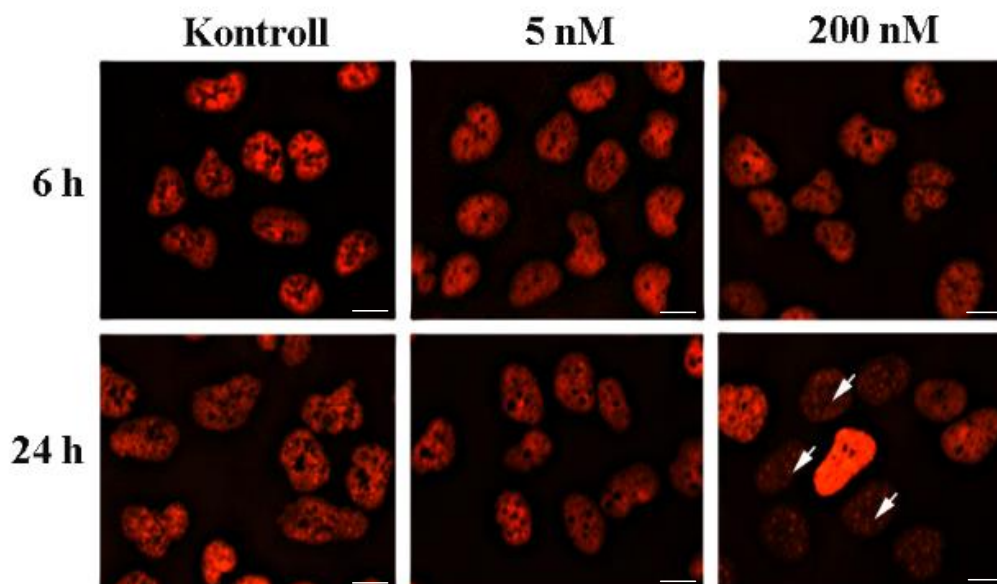
A, P53 (zöld), B, RPB1 (piros), C, S2P RPB1 (piros) és D, S5P RPB1 (piros) fehérje szintjében bekövetkező változások vizsgálata immuncitokémiával 6 és 24 órával, 5 és 200 nM AktD kezelést követően. A-D, DAPI (kék) fluoreszcens interkalálódó festék segítségével tettük láthatóvá a sejtmagokat. A lépték 30  $\mu\text{m}$ -t jelöl minden egyes minta esetében.





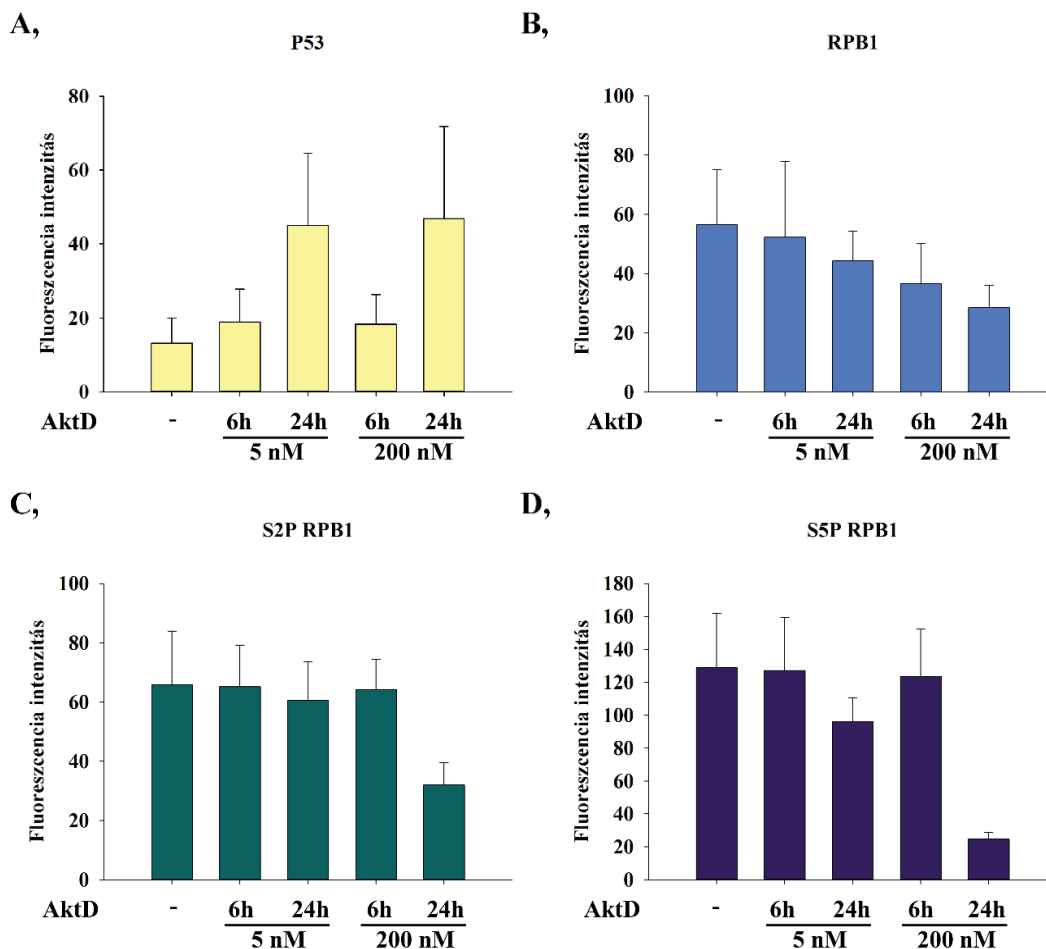
**10. ábra** Az S2P RPB1 egyedi nukleáris fókuszokban jelenik meg 24 órával 200 nM AktD kezelést követően

A 9. C, ábra középső oszlopának (S2P RPB1) nagyítása. A nyilak az egyedi sejtmagi fókuszokat jelzik 24 órával 200 nM AktD kezelést követően. A lépték 7  $\mu\text{m}$ -t jelöl minden egyes minta esetében.



**11. ábra** Az S5P RPB1 egyedi nukleáris fókuszokban jelenik meg 24 órával 200 nM AktD kezelést követően

A 9. D, ábra középső oszlopának (S5P RPB1) nagyítása. A nyilak az egyedi sejtmagi fókuszokat jelzik 24 órával 200 nM AktD kezelést követően. A lépték 7  $\mu\text{m}$ -t jelöl minden egyes minta esetében.

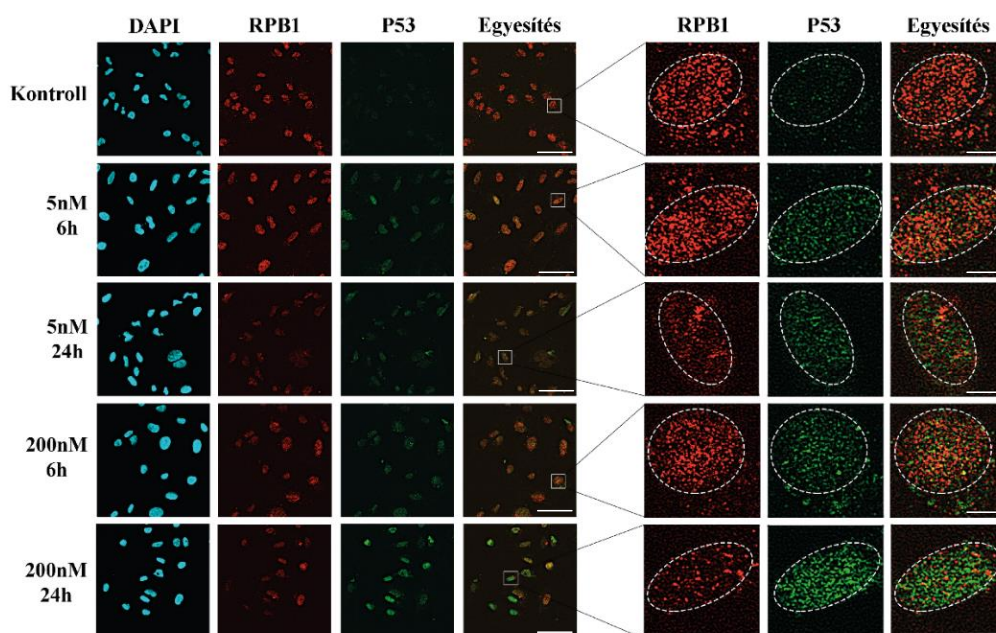


**12. ábra U2OS sejtekben immuncitokémiával vizsgált P53, RPB1, S2P RPB1 és S5P RPB1 fehérje szintjének kiértékelése**

A 9. ábrán látható fluoreszcencia intenzitások (A, P53, B, RPB1, C, S2P RPB1, D, S5P RPB1) kiértékelésének eredménye Fiji (Image J) szoftver segítségével.

**5.4. A P53 és az RPB1 együttes lokalizációja figyelhető meg AktD kezelés hatására**

Az előzőekben kimutattuk, hogy a P53 és az RPB1 fehérje szintje ellentétesen változik AktD kezelés hatására. Kíváncsiak voltunk, hogy AktD kezelést követően a sejtben felhalmozódott P53 jelen van-e azokon a helyeken, ahol az RPB1 is megjelenik. Továbbá megvizsgáltuk, hogy a P53 sejtben belüli elhelyezkedése mutat-e átfedést az iniciációra jellemző S5P RPB1-gyel, valamint az elongáló S2P RPB1-gyel AktD kezelés hatására. Ennek kivitelezésére olyan immunfestést alkalmaztunk, melynek során a citoskeletális, valamint a DNS-hez nem kötött sejtmagi fehérjéket eltávolítottuk, így kizárólag a kromatin-kötött fehérjéket mutattuk ki.



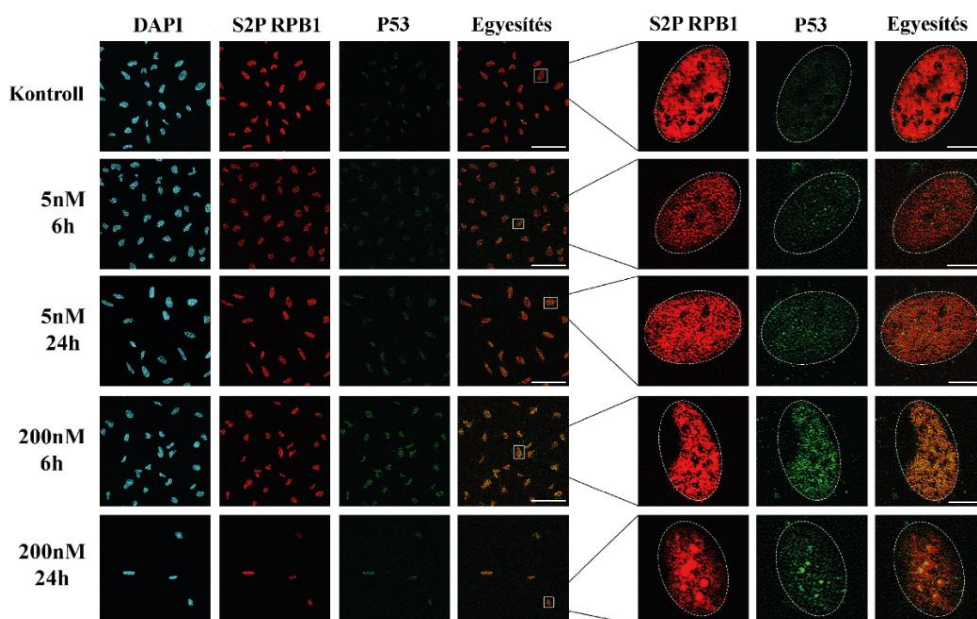
### 13. ábra A P53 és az RPB1 ko-lokalizálódik AktD kezelést követően

A P53 (zöld) és az RPB1 (piros) együttes jelenléte AktD kezelés hatására figyelhető meg. DAPI (kék) fluoreszcens interkalálódó festék segítségével tettük láthatóvá a sejtmagokat. A lépték 30  $\mu\text{m}$ -t (1-4. oszlop), illetve 4  $\mu\text{m}$ -t (5-7. oszlop) jelöl.

Átfedő RPB1 és P53 sejtmagi régiókat a kezeletlen mintákban nem figyeltünk meg, melyet részben az alacsony P53 szint okozhatott. Magas koncentrációjú AktD kezelés után 6 órával a P53 és az RPB1 ko-lokalizációja számos helyen kimutatható, míg 24 órával AktD (5 és 200 nM) kezelés után már kevesebb helyen figyelhető meg a P53 és az RPB1 fehérjék együttes elhelyezkedése (**13. ábra**). Az elongáló S2P RPB1 és a P53 főként 24 órával AktD kezelés hatására ko-lokalizálódnak egymással, ami a 200 nM-os kezelés esetében főként egyedi nukleáris fókuszokra korlátozódik (**14. ábra**).

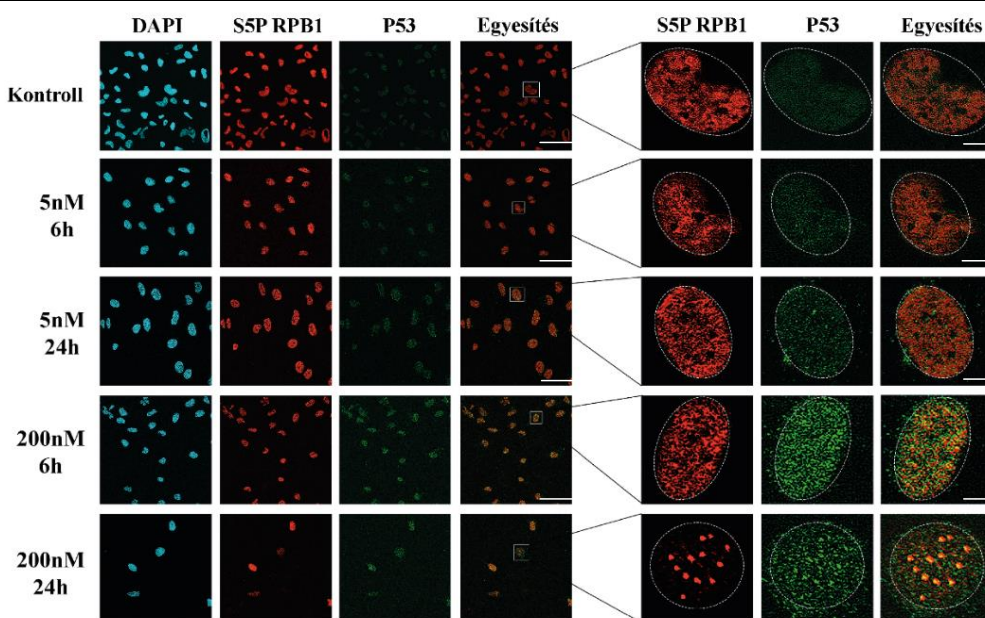
Ugyanez a mintázat érvényesül az iniciációra jellemző S5P RPB1 és a P53 ko-lokalizációja esetében is: a két fehérje együttes elhelyezkedése 24 órával a kezelést követően figyelhető meg, azonban ez a magas koncentráció esetében egyedi nukleáris fókuszokra korlátozódik (**15. ábra**). Eredményeink azt mutatják, hogy a P53 transzkripció elongációs blokk esetén ko-lokalizálódik az S5P és az S2P RPB1-gyel, ami azt sugallja, hogy a P53 nemcsak a transzkripció iniciációs, hanem elongációs szakaszában is szerepet játszhat, feltehetőleg az RNSPII-n keresztül. Ez a ko-lokalizáció 24 órával magas dózisú AktD kezelést követően egyedi nukleáris fókuszokra korlátozódik, melyek feltehetőleg a kromatinon lévő fehérje

degradációs központok helyét jelzik, ahol a transzkripció elongációs szakaszának blokkolásakor leálló RNSPII található. Az immunfestés kiértékelése a **16. ábrán** látható.



**14. ábra A P53 és az S2P RPB1 ko-lokalizálódik AktD kezelést követően**

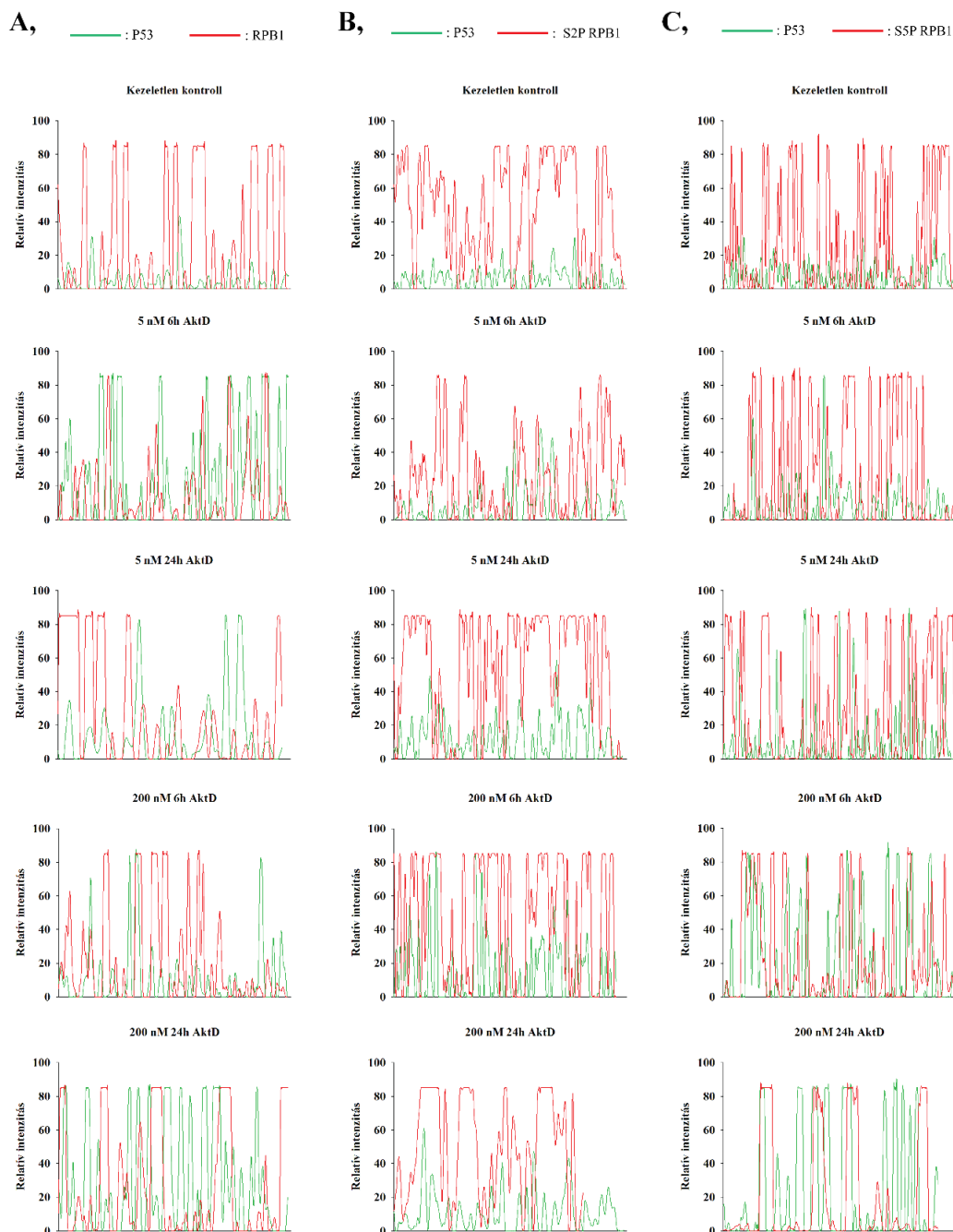
A P53 (zöld) és az S2P RPB1 (piros) együttes jelenléte AktD kezelés hatására figyelhető meg. DAPI (kék) fluoreszcens festékekkel tettük láthatóvá a sejtmagokat. A lépték 30  $\mu\text{m}$ -t (1-4. oszlop), illetve 4  $\mu\text{m}$ -t (5-7. oszlop) jelöl.



**15. ábra A P53 és az S5P RPB1 ko-lokalizálódik AktD kezelést követően**

A P53 (zöld) és az S5P RPB1 (piros) együttes jelenléte AktD kezelés hatására figyelhető meg. DAPI (kék) fluoreszcens festékekkel tettük láthatóvá a sejtmagokat. A lépték 30  $\mu\text{m}$ -t (1-4. oszlop), illetve 4  $\mu\text{m}$ -t (5-7. oszlop) jelöl.





**16. ábra A P53 és RPB1, S2P RPB1, valamint S5P RPB1 ko-lokalizációjának kiértékelése stresszmentes körülmények között és AktD kezelést követően**

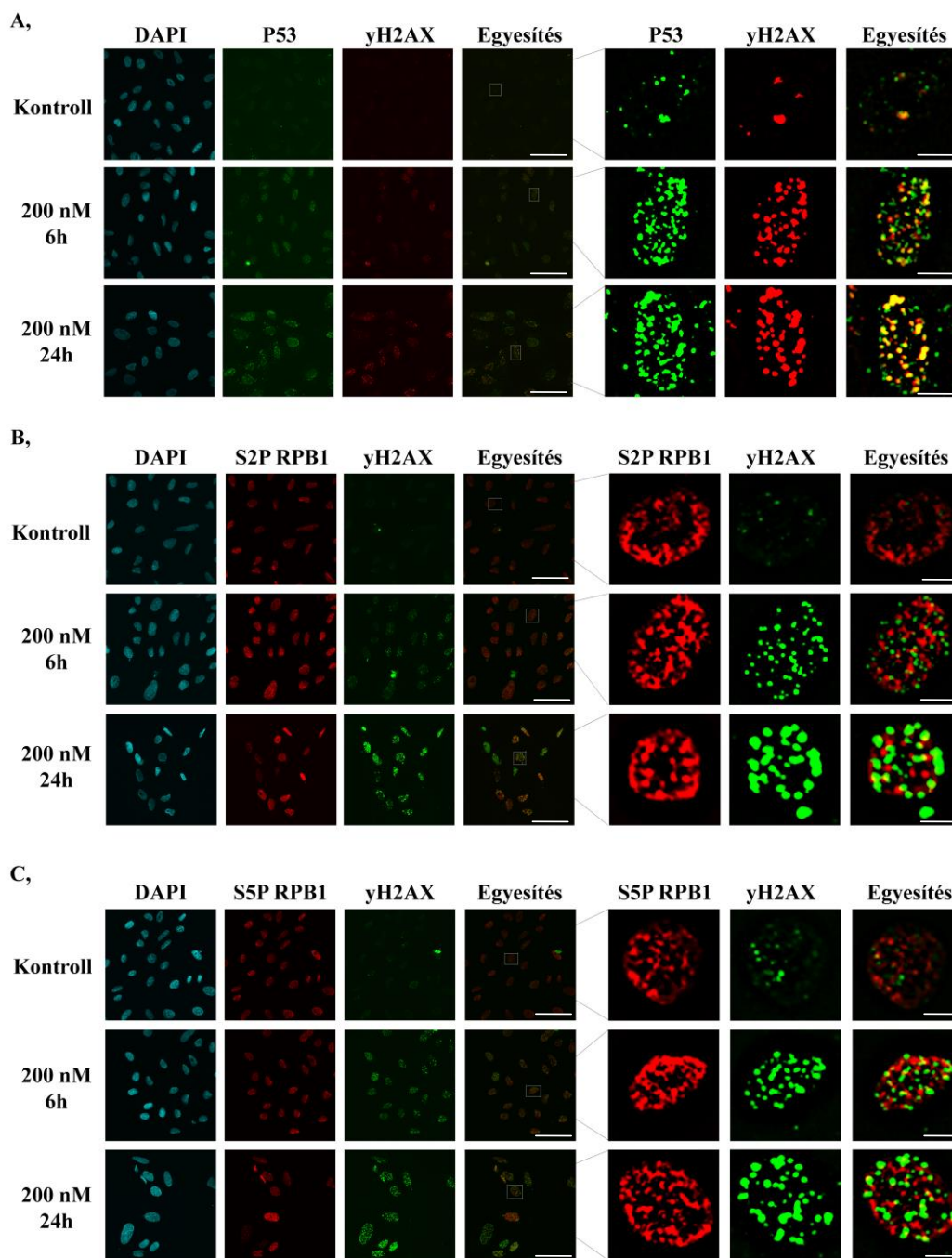
A 13-15. ábrán látható kinagyított sejtmagokban azonosítható P53 (zöld), RPB1 (piros), S2P RPB1 (piros) és S5P RPB1 (piros) intenzitásának kvantifikálása, valamint az adatokból kapott grafikonok egymásra vetítésével **A**, P53 (zöld) és RPB1 (piros), **B**, P53 (zöld) és S2P RPB1 (piros), illetve **C**, P53 (zöld) és S5P RPB1 (piros) ko-lokalizációjának ábrázolása Fiji (Image J) szoftver segítségével.

### **5.5. Az AktD magas koncentrációban kettős-szálú DNS töréseket idéz elő, mely a transzkripció folyamatának leállításához vezet**

Korábbi eredményekből már ismert, hogy az AktD magas koncentrációban kettős-szálú DNS töréseket idéz elő (62). DNS károsodás hatására a DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) és az ATM által szabályozott transzkripció gátlása a károsodás helyén következik be, mely az RNSPII ubiquitin-függő degradációjához vezet (149-151). Ahhoz, hogy vizsgáljuk, hogy az általunk használt kísérleti elrendezésben az AktD által indukált transzkripciós blokk kettős-szálú DNS törést eredményez-e, valamint hogy a P53 jelen van-e ezeken a helyeken, a P53 és a  $\gamma$ H2AX– kettős-szálú DNS törések hatására az ATM kináz foszforilálja a H2AX-et Ser-139-es aminosaván - eloszlását vizsgáltuk CSK immunfestéssel 6 és 24 órával AktD kezelést követően. A kontroll minták esetében alacsony volt a P53 és a  $\gamma$ H2AX szintje, azonban AktD kezelést követően 6 és 24 órával a fókuszokban megfigyelhető fehérjék mennyisége jelentősen emelkedett. Ezen kívül AktD kezelést követően megfigyelhetjük a  $\gamma$ H2AX és a P53 ko-lokalizációját az egyedi sejtmagi fókuszokban, ami feltehetőleg azokat a helyeket mutatja, ahol DNS hibajavítás történik (**17. A, ábra**).

Ahhoz, hogy kiderítsük, az AktD által indukált DNS sérülés a transzkripció folyamatának csendesítését eredményezi-e, CSK immunfestéssel vizsgáltuk a  $\gamma$ H2AX és az RPB1 foszforilált formáinak (S2P RPB1 és S5P RPB1) ko-lokalizációját 6 és 24 órával AktD kezelést követően. Azt találtuk, hogy sem az S2P RPB1, sem pedig az S5P RPB1 nem ko-lokalizálódik a  $\gamma$ H2AX-szel, mely alátámasztja, hogy a DNS hibajavítás során a transzkripció leáll és az RNSPII feltehetőleg eltávolításra kerül a hibajavítási fókuszokból, hogy teret engedjen a hibajavító faktorok számára (**17. B, C, ábra**) (152-155).

Eredményeink azt mutatják, hogy a DNS hibajavítás helyein a transzkripció folyamata leáll. Korábbi irodalmi adatok alapján ismert, hogy DNS sérülés esetén az ATM és a DNA-PK foszforilálja a P53 fehérjét Ser-15 oldalláncán. Az általunk kimutatott P53 és  $\gamma$ H2AX ko-lokalizációja is arra utalhat, hogy DNS sérülés esetén a P53 valamilyen módon szerepet játszik az RNSPII degradációjában (156-159). Ezt a mechanizmust feltehetőleg a leállt RNSPII, valamint a DNS károsodás hatására aktiválódott PI3K kinázok egyaránt indukálják.

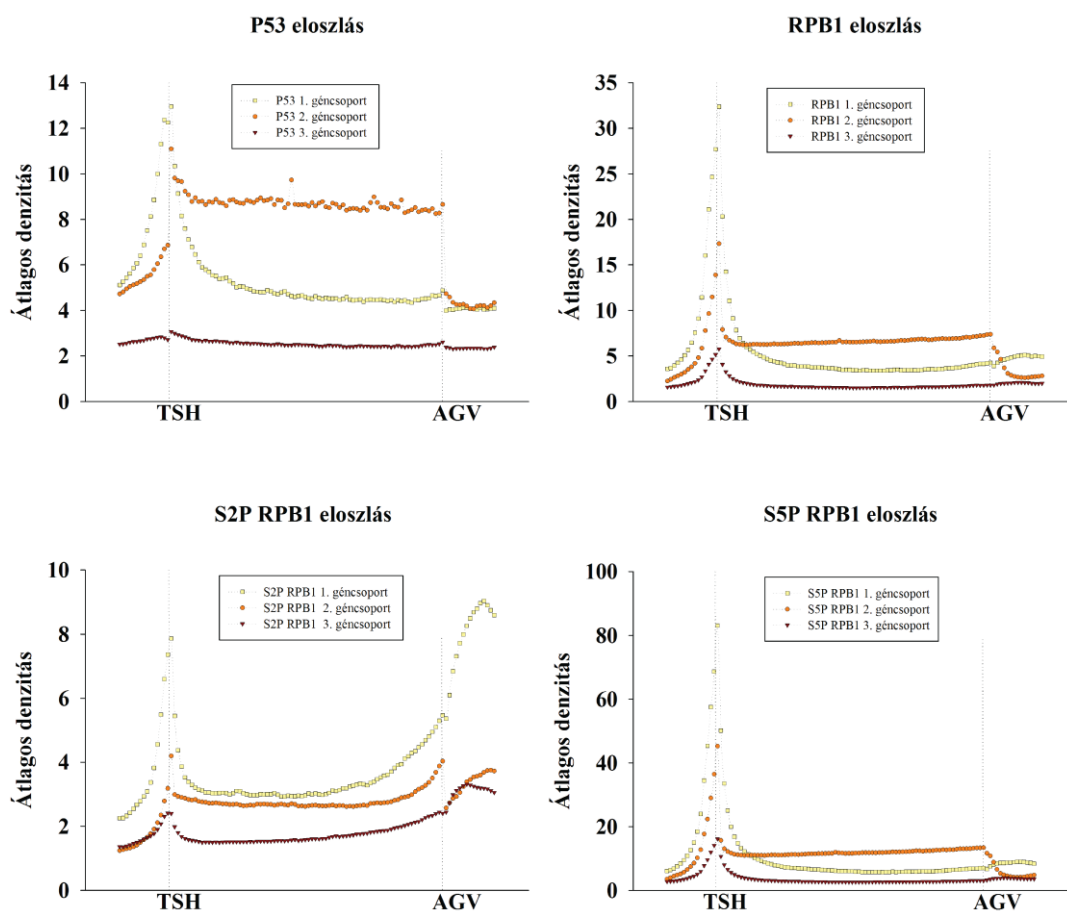


**17. ábra A P53 és a  $\gamma$ H2AX ko-lokalizálódik AktD kezelést követően**

**A,** A P53 (zöld) és a  $\gamma$ H2AX (piros) együttes jelenléte AktD kezelés hatására figyelhető meg. **B,** Az S2P RPB1 (piros) és a  $\gamma$ H2AX (zöld) nem ko-lokalizálódnak AktD kezelést követően. **C,** Az S5P RPB1 (piros) és a  $\gamma$ H2AX (zöld) nem ko-lokalizálódnak AktD kezelést követően. DAPI (kék) fluoreszcens interkalálódó festék segítségével tettük láthatóvá a sejtmagokat. A lépték 30  $\mu$ m-t (1-4. oszlop), illetve 4  $\mu$ m-t (5-7. oszlop) jelöl.

## 5.6. A P53 kötődése megfigyelhető transzkripciósan aktív géneken

Az előzőekben bemutatott eredmények arra utalnak, hogy a P53 és az RNSPII egyazon sejtmagi fókuszokban helyezkednek el. Annak eldöntésére, hogy a két fehérje tényleg ugyanazon a génszakaszokon helyezkedik el, korábban publikált, U2OS sejteken végzett ChIP-seq adatok analízisével vizsgáltuk a P53 (srr847010, srr847017), az RPB1 (srr987271), az S2P RPB1 (srr987275) és az S5P RPB1(srr987273) eloszlását az átíródó transzkripció egységeken (160,161) (**18. ábra**).



**18. ábra** A P53 és az RPB1 hasonló eloszlást mutat a különböző géncsoportok esetében a kiértékelt ChIP-seq adatok alapján

**A**, P53, **B**, RPB1, **C**, S2P RPB1 és **D**, S5P RPB1 eloszlása a transzkripció start helyétől (TSH) az annotált gén végéig (AGV).

Első lépésben a P53 átlagos eloszlását vizsgáltuk annotált géneken, valamint a gének körüli 1500 bp-os régióban. A vizsgált géneket három különböző csoportra osztottuk a P53 és az RNSPII eloszlása alapján. Az 1. géncsoport esetében a P53 és az RPB1 kötődése



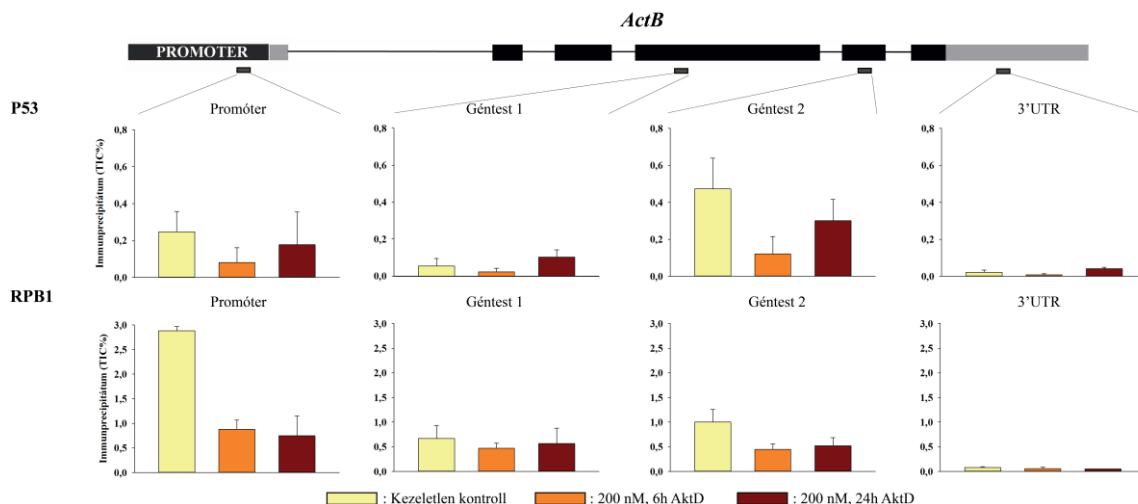
főként a transzkripciós start hely (TSH) környékén figyelhető meg. A 2. csoportba tartozó géneknél a P53 és az RPB1 kötődése nagyrészt az átíró régiókra korlátozódik, a TSH-nál csak kis mértékben van jelen mindkét fehérje. A 3. csoportba tartozó géneken a P53 nem mutat kötődést, míg az RPB1 is csak kis mértékben van jelen a TSH környékén. Az adatok analízise alapján feltételezhetjük, hogy a P53 mintázata és a génexpressziós szint között kapcsolat van: a P53 kötődése megfigyelhető a magas expressziós mintázatot mutató gének teljes átíró régiójában.

### **5.7. Az RPB1 és a P53 fehérje kötődése megfigyelhető olyan génszakaszokon, melyek nem tartoznak a P53 közvetlen célgénjei közé**

Az előzőek során kiértékelt ChIP-seq adatok azt jelzik, hogy a P53 és az RPB1 megtalálható az átíró gének nagy részén. A ChIP-seq adatok alátámasztására és a két fehérje kötődésének további vizsgálatához kromatin immunprecipitációs kísérleteket végeztünk U2OS sejteken. A két fehérje eloszlását az *ActB*, a *Cdk12*, a *Brat1* és az *Sdcbp* gének promóter, Géntest 1, Géntest 2 és 3'UTR szakaszán vizsgáltuk. Az *ActB*, a *Cdk12* és a *Brat1* a ChIP-seq adatok alapján az 1. csoportba sorolhatók, míg az *Sdcbp* gén a 2. géncsoportba tartozik. A kísérlet pozitív kontrolljaként egy jól ismert P53 célgént, a *P21*-et választottuk, melynek promóter régióján vizsgáltuk a P53 és az RNSPII jelenlétét különböző körülmények között. Negatív kontrollként egy géneket nem tartalmazó intergenikus szakaszt (**23. ábra**) vizsgáltunk, melyről nem történik mRNS átíródás.

Eredményeink alátámasztják a ChIP-seq kísérletben tapasztalt P53 és RNSPII fehérje kötődési mintázatokat, mivel a P53 jelen van olyan gének különböző régióin, melyek nem közvetlen célgénjei: *ActB*, *Cdk12*, *Brat1* és *Sdcbp*. A P53 az *ActB* gén esetében főként a promóteren és a Géntest 2 szakaszon mutat nagyobb mértékű kötődést (**19. ábra**). Stresszmentes körülmények között a P53 hasonló eloszlást mutat a *Brat1* (**21. ábra**) esetében is, míg az *Sdcbp* (**22. ábra**) esetében a P53 kötődése elhanyagolható. A *Cdk12* gén (**20. ábra**) esetében a P53 eloszlása főként a géntest régiókon figyelhető meg, míg a promóter régióban a kezeletlen mintákban nem tapasztaltunk P53 kötődést. Az RPB1 az összes vizsgált gén esetében hasonló eloszlást mutat: (I) az 1. csoportba tartozó *ActB* (**19. ábra**), *Cdk12* (**20. ábra**) és *Brat1* (**21. ábra**) esetében túlnyomórészt a promóter régióhoz kötődik, azonban a Géntest 1 és a Géntest 2 régióban is egyaránt megfigyelhető. (II) A 2. csoportba tartozó *Sdcbp* (**22. ábra**) Géntest 2 régiójában tapasztaltunk jelentős mértékű kötődést, ami alátámasztja a korábban bemutatott ChIP-seq adatokat is. Ennek ellenére az

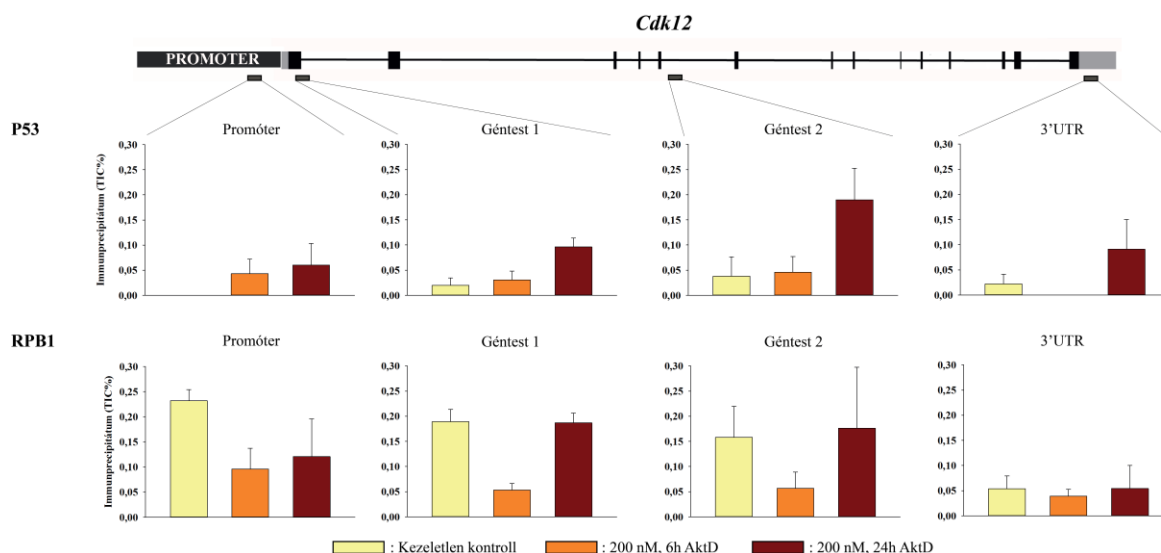
*Sdcbp* promóter régiójánál is nagy mértékű RPB1 kötődést tapasztaltunk (22. ábra). A vizsgált gén 3'UTR (3' untranslated region) szakaszán nem tapasztaltunk RPB1 kötődést.



**19. ábra A P53 és az RPB1 hasonló eloszlást mutat az *ActB* gén különböző szakaszain, alapállapotban és transzkripció elongációs blokk esetén**

Kromatin immunprecipitációval vizsgáltuk a P53 és az RPB1 kötődését az *ActB* gén promóter, Géntest 1, Géntest 2, valamint 3'UTR régiójában kezeletlen, valamint 200 nM AktD-vel kezelt U2OS kromatinon 6 és 24 órát követően. Az *ActB* gén sematikus szerkezete, valamint a vizsgált gén régiók elhelyezkedése a diagramok felett látható. A P53 és az RPB1 kötődését az immunprecipitációhoz használt kromatin mennyiség (total input) százalékos arányában ábrázoltuk (TIC%).

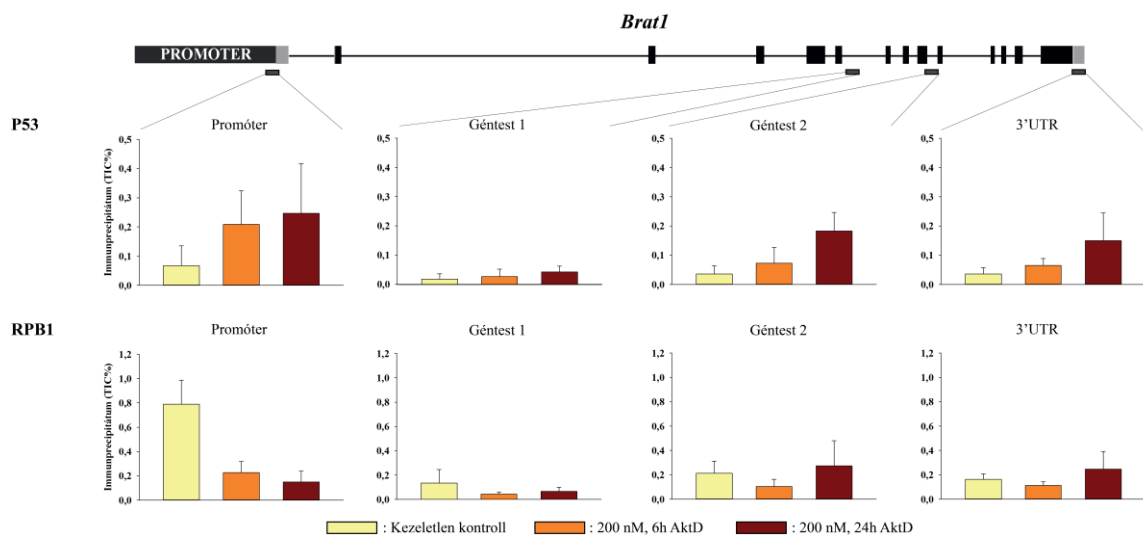
Mivel a ChIP-seq adatok alapján a P53 eloszlása az elongáló RPB1-gyel mutatott hasonlóságot, U2OS sejteken kromatin immunprecipitációt végeztünk transzkripció blokk indukcióját követően, hogy vizsgáljuk, hogyan változik a P53 kötődése a vizsgált génszakaszokon. Ennek kivitelezéséhez U2OS sejteket magas koncentrációjú AktD-vel kezeltünk, majd 6 és 24 órával a kezelést követően tanulmányoztuk a P53 és az RNSPII mintázatában bekövetkező változásokat a vizsgált génszakaszokon. A P53 hasonló mintázatot mutat a legtöbb vizsgált gén (*Cdk12*, *Brat1*, *Sdcbp* és *P21*) különböző szakaszain: 6 órával AktD kezelést követően a P53 kötődése nagyobb mértékű, majd 24 órával a kezelés után még jelentősebb kötődést tapasztaltunk a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. A P53 mintázatában az 1. géncsoportba tartozó *Cdk12* (20. ábra) és *Brat1* (21. ábra) promóter szakaszán, valamint a 2. géncsoportba tartozó *Sdcbp* (22. ábra)



## 20. ábra A P53 és az RPB1 eltérő eloszlást mutat a *Cdk12* gén különböző szakaszain, alapállapotban és transzkripció elongációs blokk esetén

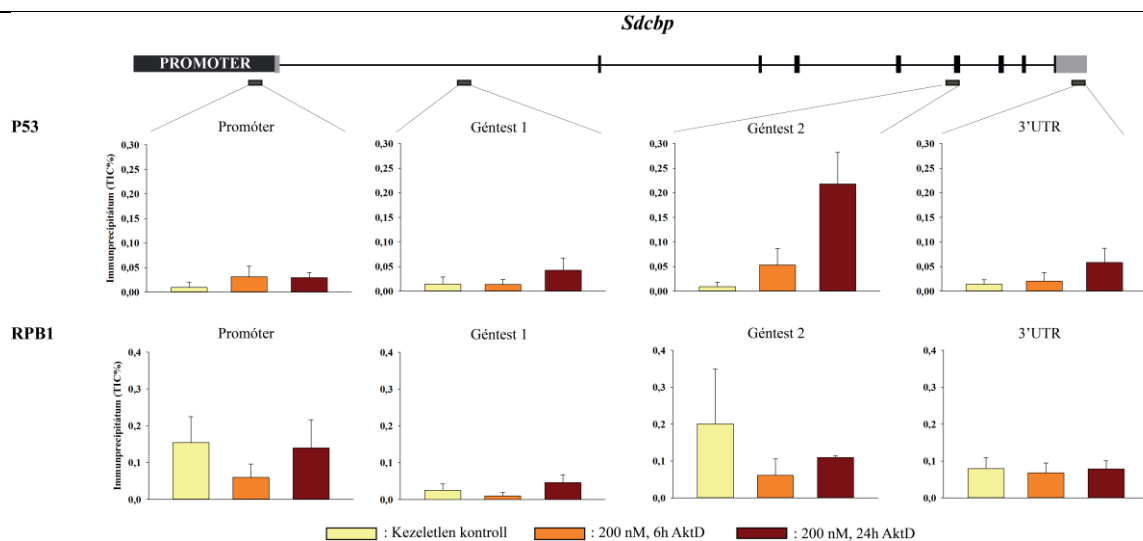
Kromatin immunprecipitációval vizsgáltuk a P53 és az RPB1 kötődését a *Cdk12* gén promóter, Géntest 1, Géntest 2, valamint 3'UTR régiójában kezeletlen, valamint 200 nM AktD-vel kezelt U2OS kromatinon 6 és 24 órát követően. A *Cdk12* gén sematikus szerkezete, valamint a vizsgált gén régiók elhelyezkedése a diagramok felett látható. A P53 és az RPB1 kötődését az immunprecipitációhoz használt kromatin mennyiség (total input) százalékos arányában ábrázoltuk (TIC%).

Géntest 2 szakaszán tapasztaltunk nagyobb mértékű változást 6 órával AktD kezelést követően. A P53 a legnagyobb mértékű kötődést 24 órával AktD kezelést követően mutatja a legtöbb vizsgált régióban. Az *ActB* gén esetében a P53 mintázata eltér a többi génen mutatott eloszlástól - ebben az esetben a P53 és az RPB1 hasonló mintázatot mutat: az *ActB* promóter, Géntest 1 és Géntest 2 szakaszán a kezeletlen minták esetében mindkét fehérje kötődik, majd 6 órával AktD hatására ez a kötődés csökken, 24 óra után pedig ismét emelkedést tapasztalunk (19. ábra). Ez a mintázat a P53 fehérje esetén sokkal erőteljesebb, míg az RPB1 kötődésében kisebb mértékű változás figyelhető meg 24 órát követően. Az RPB1 mintázatában a többi gén esetében is ezt a kinetikát figyelhetjük meg: 6 órával AktD kezelés után az RPB1 kötődése jelentős mértékben csökken, majd 24 órát követően az RPB1 újra megjelenik. Az *ActB* (19. ábra), a *Brat1* (21. ábra) és a *P21* (23. ábra) promóter régiójában azonban az RPB1 kötődési mintázatában csökkenést tapasztaltunk.



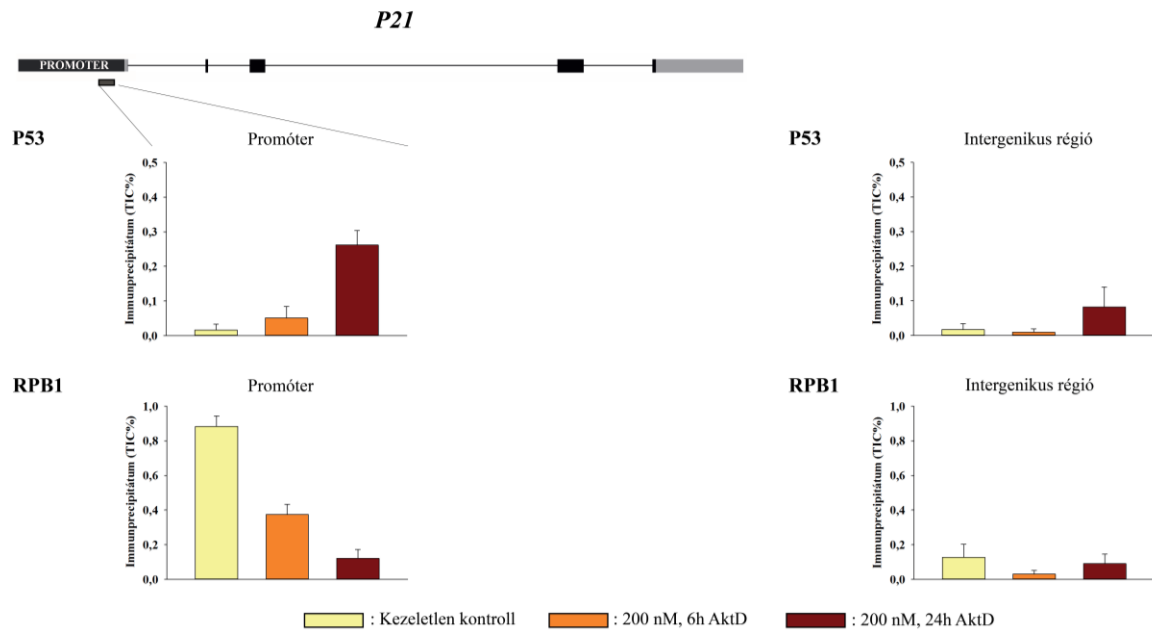
**21. ábra A P53 és az RPB1 eltérő eloszlást mutat a *Brat1* gén különböző szakaszain, alapállapotban és transzkripció elongációs blokk esetén**

Kromatin immunprecipitációval vizsgáltuk a P53 és az RPB1 kötődését a *Brat1* gén promóter, Géntest 1, Géntest 2, valamint 3'UTR régiójában kezeletlen, valamint 200 nM AktD-vel kezelt U2OS kromatinon 6 és 24 órát követően. A *Brat1* gén sematikus szerkezete, valamint a vizsgált gén régiók elhelyezkedése a diagramok felett látható.



**22. ábra A P53 és az RPB1 eltérő eloszlást mutat az *Sdcbp* gén különböző szakaszain, alapállapotban és transzkripció elongációs blokk esetén**

Kromatin immunprecipitációval vizsgáltuk a P53 és az RPB1 kötődését az *Sdcbp* gén promóter, Géntest 1, Géntest 2, valamint 3'UTR régiójában kezeletlen, valamint 200 nM AktD-vel kezelt U2OS kromatinon 6 és 24 órát követően. Az *Sdcbp* gén sematikus szerkezete, valamint a vizsgált gén régiók elhelyezkedése a diagramok felett látható.



**23. ábra A P53 és az RPB1 eltérő eloszlást mutat a *P21* gén promóter régióján, alapállapotban és transzkripció elongációs blokk esetén**

Kromatin immunoprecipitációval vizsgáltuk a P53 és az RPB1 kötődését a *P21* gén promóter régiójában kezeletlen, valamint 200 nM AktD-vel kezelt U2OS kromatinon és 24 órát követően. A *P21* gén sematikus szerkezete, valamint a vizsgált gén régiók elhelyezkedése a diagramok felett látható. A kromatin immunoprecipitáció negatív kontrolljaként intergenikus régióra tervezett primereket használtunk. A P53 és az RPB1 kötődését az immunprecipitációhoz használt kromatin mennyiség (total input) százalékos arányában ábrázoltuk (TIC%).

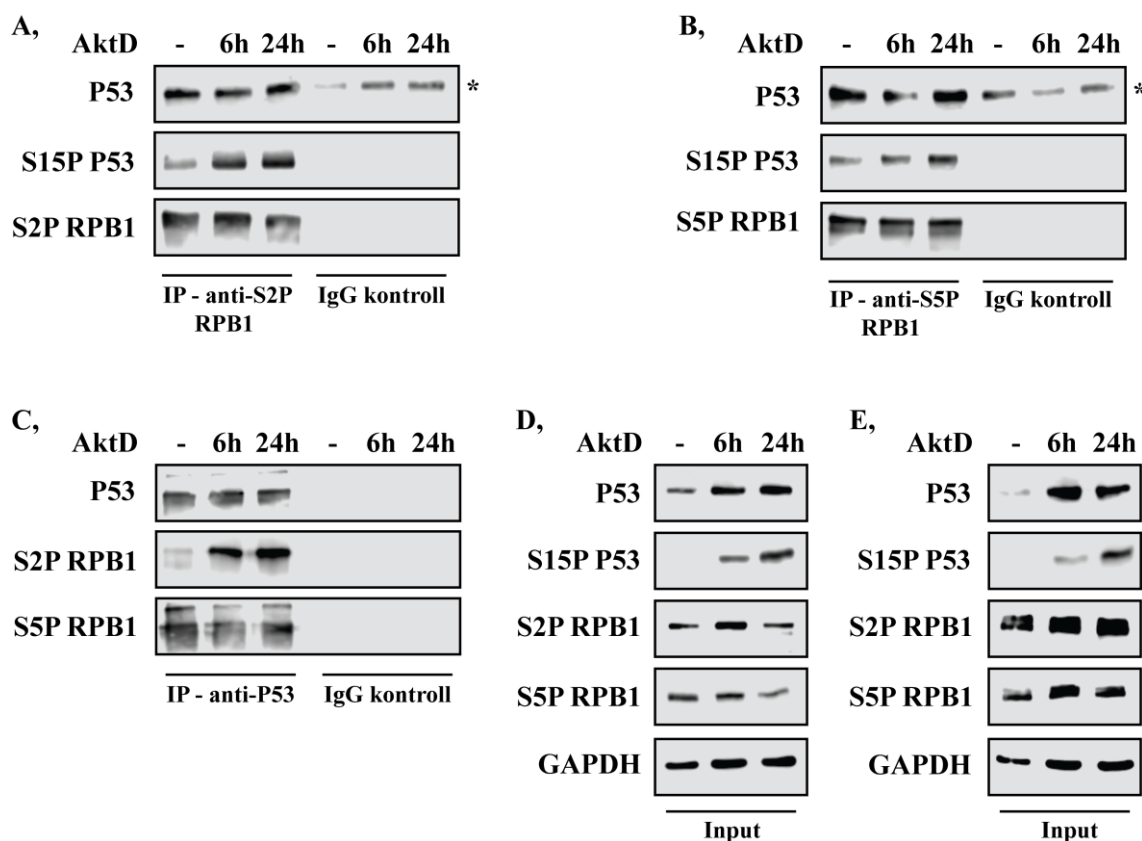
Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a P53 jelen van transzkripciósan aktív gének különböző szakaszain, valamint, hogy kötődése a transzkripció elongációs szakaszának blokkolásakor a legtöbb vizsgált génszakaszon emelkedik. Eddigi adatainkból arra következtethetünk, hogy a P53 együtt halad az RPB1-gyel az aktívan átíródó génszakaszokon, majd transzkripció elongációs blokk esetében a P53 szerepet játszhat az RPB1 kromatinról történő eltávolításában, hogy elősegítse a DNS hibajavító faktorok hozzáférését a keletkezett DNS hibákhoz.

## 5.8. A P53 kölcsönhat az RPB1-gyel

Előzetes eredmények bizonyítják, hogy a P53 kölcsönhat a TFIIH, ELL (elongation factor RNA polymerase II) és hPAF1C transzkripció elongációs fehérjékkel, ami azt sugallja, hogy a P53-nak szerepe lehet a transzkripció elongáció során (138,139,162). Továbbá élesztő heterológ rendszerben kimutatták, hogy a humán P53 fehérje kölcsönhat az élesztő RPB1-gyel, viszont a két fehérje közti kölcsönhatást emlős kísérleti rendszerben még nem vizsgálták (141). Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy a P53 és az RPB1 együttes jelenléte megfigyelhető a kromatinon a transzkripció elongáció blokkolásakor. Ezen kívül a vizsgált génszakaszokon mindkét fehérje kötődését kimutattuk 6 és 24 órával AktD kezelést követően. Ezekből kiindulva egyik feltevésünk volt, hogy a P53 kölcsönhatást alakíthat ki az elongáló RPB1-gyel, és ezen keresztül játszhat szerepet a transzkripció elongáció szabályozásában. Ennek megválaszolására ko-immunprecipitációs kísérleteket végeztünk stresszmentes körülmények között és AktD kezelést követően 6 és 24 órával (**24. ábra**). Az immunprecipitációt anti-S2P RPB1 (az elongációra jellemző S2P RPB1-et felismerő antitest), illetve anti-S5P RPB1 (az iniciációra jellemző S5P RPB1-et felismerő antitest) antitestekkel végeztük, majd a Western blot során anti-P53, valamint annak S15P foszforilált formáját felismerő ellenanyagot alkalmaztunk, hogy kimutassuk az RPB1 különböző formái és a P53 között esetlegesen fennálló kölcsönhatást. Az immunprecipitáció sikerességét anti-S2P RPB1 (**24. A, ábra**), valamint anti-S5P RPB1 (**24. B, ábra**) antitestekkel ellenőriztük. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy stresszmentes körülmények között a P53 és annak S15P aktív formája is kölcsönhat az RPB1 iniciációra és elongációra specifikus foszforilált formáival. A kölcsönhatás kimutatható 6 és 24 órával AktD kezelést követően is, ami alátámasztja az immunfestés során kapott eredményeinket, ahol kimutattuk, hogy transzkripció elongációs blokk indukcióját követően a P53 és az S5P RPB1, valamint az S2P RPB1 egyedi sejtmagi fókuszokban ko-lokalizálódnak.

A 23. D, ábrán feltüntetett Western bloton az immunprecipitációhoz használt U2OS teljes sejtlizátumból származó minták láthatóak, ami minden egyes immunprecipitáció esetében a Western blot kontrolljaként szolgál (**24. D, ábra**).

Eredményeink rámutatnak arra, hogy a P53 kölcsönhat az RPB1 foszforilált formáival mind stresszmentes körülmények között, mind pedig transzkripciós blokk indukcióját követően.



#### 24. ábra A P53 kölcsönhat az S2P RPB1 és az S5P RPB1 fehérjékkel

**A,** P53 illetve S15P P53 és S2P RPB1, **B,** P53 illetve S15P P53 és S5P RPB1 közti kölcsönhatás vizsgálata ko-immunprecipitációval stresszmentes körülmények között, valamint 6 és 24 órával 200 nM AktD kezelés után. Az immunprecipitációt anti-S2P RPB1 (**A,**) illetve anti-S5P-RPB1 (**B,**) antitestekkel végeztük. Az IgG kontroll a kísérlet negatív kontrollja. Az A, és B, ábra esetében feltüntetett \* az IgG nehézláncokat jelöli. **C,** Az A, és B, ábrán látható eredmények alátámasztása anti-P53 antitesttel végzett immunprecipitációval. **D,** Az A, és B, ábrán látható ko-immunprecipitációk input kísérlete. **E,** A C, ábrán feltüntetett ko-immunprecipitációs kísérlet input kontrollja. Az „Input” minták esetében teljes sejtlizátumban vizsgáltuk a P53, az S15P P53 és az S2P RPB1, valamint az S5P RPB1 fehérje szintjét. Az egyenletes mintafelvétel pozitív kontrolljaként anti-GAPDH antitestet alkalmaztunk.

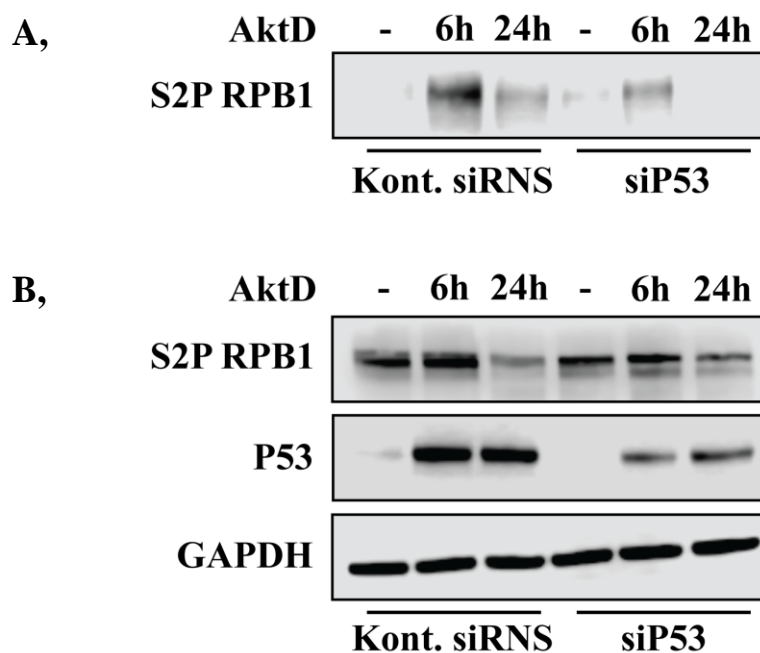
A ko-immunprecipitációs kísérletek megerősítésére anti-P53 antitesttel is elvégeztük az immunprecipitációt, majd a Western blotnál anti-S2P RPB1, illetve anti-S5P RPB1 antitesteket alkalmazva vizsgáltuk a kölcsönhatást stresszmentes körülmények között, illetve 6 és 24 órával AktD kezelést követően (**24. C, ábra**). A 23. E, ábrán feltüntetett Western bloton az immunprecipitációhoz használt U2OS teljes sejtlizátumból származó

minták láthatóak, ami minden egyes immunprecipitáció esetében a Western blot kontrolljaként szolgál (**24. E, ábra**). Kísérleteink megerősítik korábbi eredményeinket: a P53 kölcsönhat az RPB1 iniciációra, illetve elongációra specifikus aktív formájával is.

### **5.9. A P53-nak szerepe van az S2P RPB1 ubiquitilációjában transzkripció elongációs blokk esetében**

Eddigi kísérleteinkben igazoltuk a P53 és az RPB1 együttes jelenlétét és kölcsönhatását. Továbbá azt tapasztaltuk, hogy azokon a kromatin régiókon, ahol az RPB1 kötődése 6 és 24 órával az AktD kezelést követően csökkenést mutat, a P53 mintázata ennek ellenkezőjét mutatta. Végül kimutattuk, hogy a P53 és az RPB1 kölcsönhatnak egymással mind stresszmentes körülmények között, mind pedig transzkripció blokk esetén. Ezekből az adatokból kiindulva feltételezésünk volt, hogy a P53-nak szerepe lehet a már korábban kimutatott RPB1 globális fehérje szint csökkenésében is, mely transzkripció blokk indukciójakor következik be. DNS károsodás esetén a hibajavító faktorok hozzáférése a sérült DNS-hez különböző módokon valósulhat meg: (I) különböző faktorok (pl. CSB) segítségével a hiperfoszforilált RNSPII konformációja megváltozik, (II) a hiperfoszforilált RNSPII és a transzkripció buborék visszafelé elmozdul („backtracking”) az RNS-en, (III) az RNSPII ubiquitiláció által szabályozott proteasómális lebontása történik meg (24,57,163,164). Eddigi kísérleteink azt mutatják, hogy transzkripció elongációs blokkot követően az RNSPII fehérje szintje jelentős mértékben lecsökken, jelentős része leválik a DNS-ről, valamint jelenléte egyedi sejtmagi fókuszokra korlátozódik, melyek feltehetőleg degradációs centerek. Annak kiderítésére, hogy az RNSPII fehérje szintjében megfigyelt csökkenés transzkripció elongációs blokkot követően ubiquitiláció által szabályozott degradáció következménye-e, agaróz-TUBE pull-down kísérletet végeztünk AktD-vel kezelt U2OS sejtekből származó fehérje mintákon. Korábbi adatok alapján tudjuk, hogy főként az RPB1 elongációra jellemző formája ubiquitilálódik, ezért kísérletünkben az S2P RPB1 ubiquitilációját vizsgáltuk transzkripció blokkot követően. Jelentős mértékű ubiquitilációt figyelhetünk meg az S2P RPB1 esetében 6 órával magas koncentrációjú AktD kezelést követően. 24 órával 200 nM AktD kezelés után azonban kevesebb ubiquitilált S2P RPB1-et mutattunk ki. Ezen kívül vizsgáltuk, hogy a P53 befolyásolja-e az S2P RPB1 ubiquitilációjának mértékét 6 és 24 órával a transzkripció elongációjának gátlásakor (**25. A, ábra**). Ehhez a P53 gént siRNS-el csendesítettük, majd az ubiquitilált S2P RPB1 mennyiségét 6 és 24 órával 200 nM AktD kezelést követően vizsgáltuk. A P53



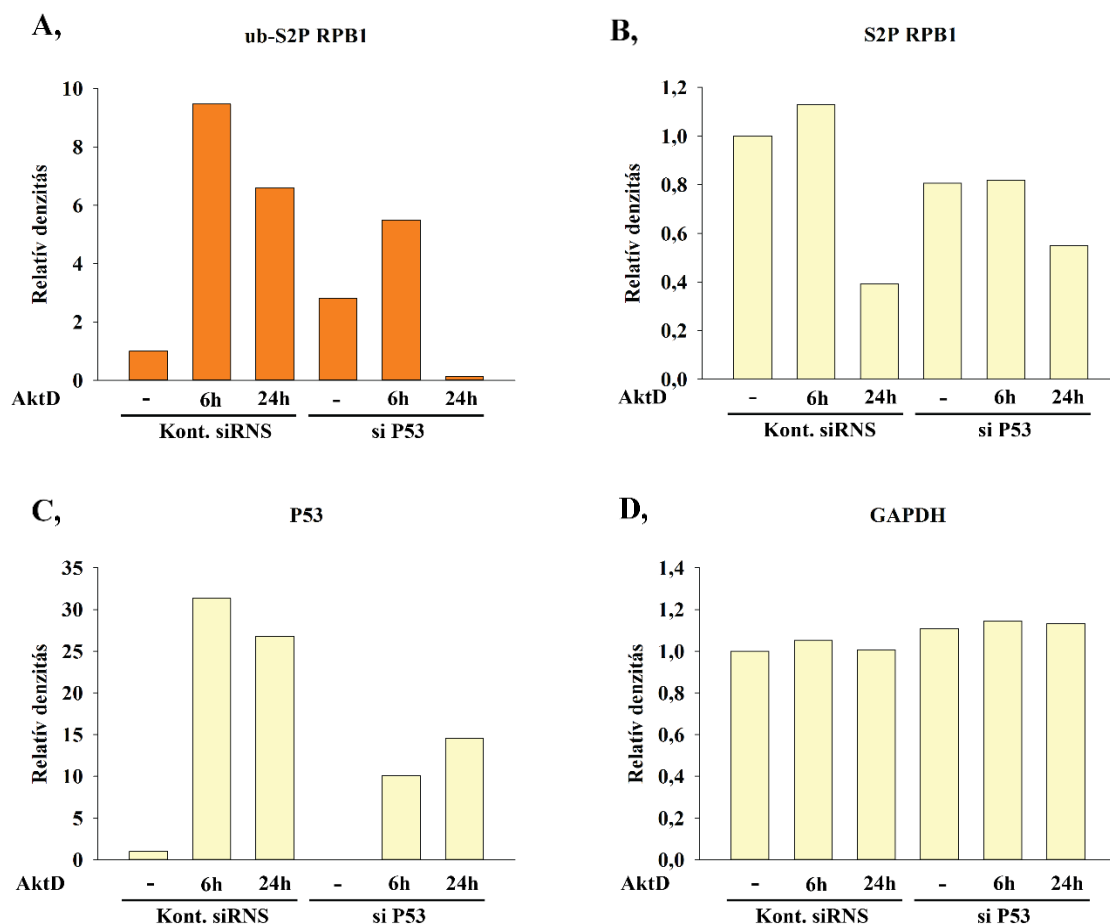


**25. ábra A P53-nak szerepe van az S2P RPB1 ubiquitilációjában transzkripció elongációs blokk esetén**

**A,** A TUBE kísérlettel elválasztott ubiquitilált S2P RPB1 kimutatása Western blottal stresszmentes körülmények között, illetve 6 és 24 órával 200 nM AktD kezelést követően P53 csendesített (siP53) és kontroll (Kont. siRNS) mintákban. **B,** A TUBE kísérlet input mintáiban az S2P RPB1 és a P53 fehérjék Western blot analízise 6 és 24 órával 200 nM AktD kezelést követően P53 jelenlétében (Kont. siRNS) és annak hiányában (siP53). Annak ellenőrzésére, hogy mindegyik mintából azonos mennyiséget vittünk fel a gélre, anti-GAPDH ellenanyagot alkalmaztunk. Kontrollként olyan siRNS-t (Kont. siRNS) alkalmaztunk, mely nem csendesít gént, a P53 gén csendesítésére pedig P53 siRNS-t (si P53) alkalmaztunk.

hiányában az ubiquitilált S2P RPB1 mennyisége jelentős csökkenést mutat AktD kezelést követően. Összevetve a transzkripció elongációs blokk hatására ubiquitilált S2P RPB1 mennyiségét P53 jelenlétében és annak hiányában, azt tapasztaltuk, hogy a P53 jelenlétében 6 óránál tapasztalt nagy mennyiségű ubiquitilált S2P RPB1 jelentős csökkenést mutat P53 hiányában; a 24 órás minták esetében az ubiquitilált S2P RPB1 szintje szinte teljesen lecsökkent. Továbbá az input mintákban megfigyelhető S2P RPB1 szint P53 hiányában magasabb a 24 órás AktD kezelés hatására, mint P53 jelenlétében (**25. B, ábra**), ami alátámasztja, hogy a P53 fehérje jelenléte szükséges az RPB1 elongáló formájának ubiquitiláció-függő degradációjához. A Western blot kiértékelése a **26. ábrán**

van feltüntetve. Kísérleteink rámutatnak arra, hogy a P53-nak szerepe van az elongáló RPB1 ubiquitilációjában transzkripció elongációs blokk esetén.

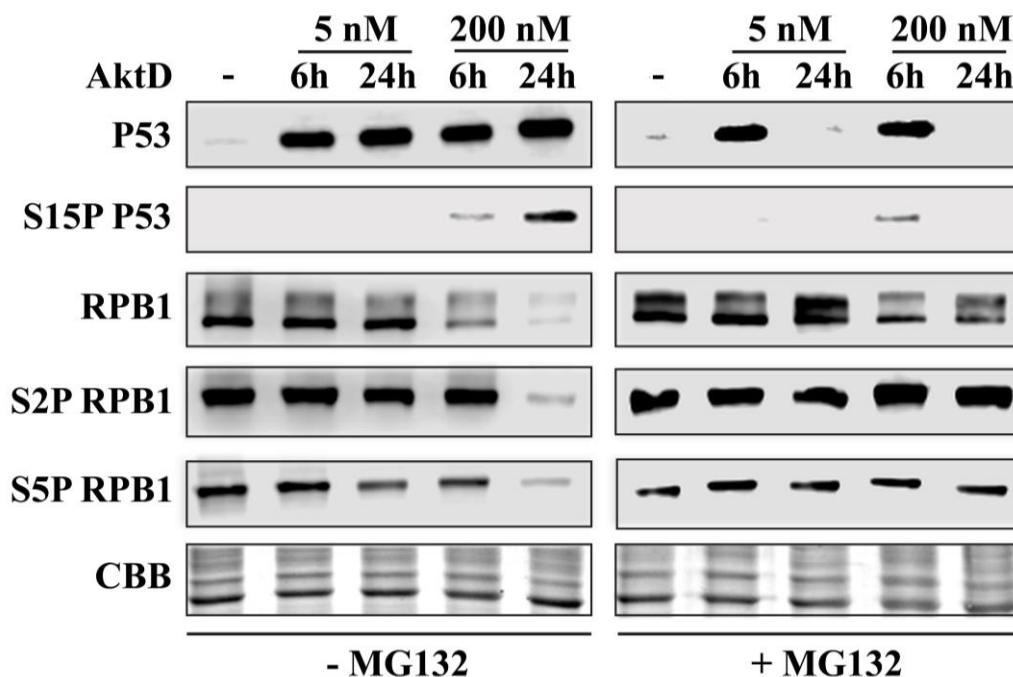


## 26. ábra A TUBE kísérlet kiértékelése

A 25. ábrán látható **A**, TUBE kísérlet és input mintáiban látható **B**, S2P RPB1, **C**, P53, **D**, GAPDH fehérje mennyiségének kiértékelése Fiji (Image J) szoftverrel.

## 5.10. Transzkripció elongációs blokk esetén az RPB1 ubiquitin-függő lebontását a 26S proteoszóma végzi

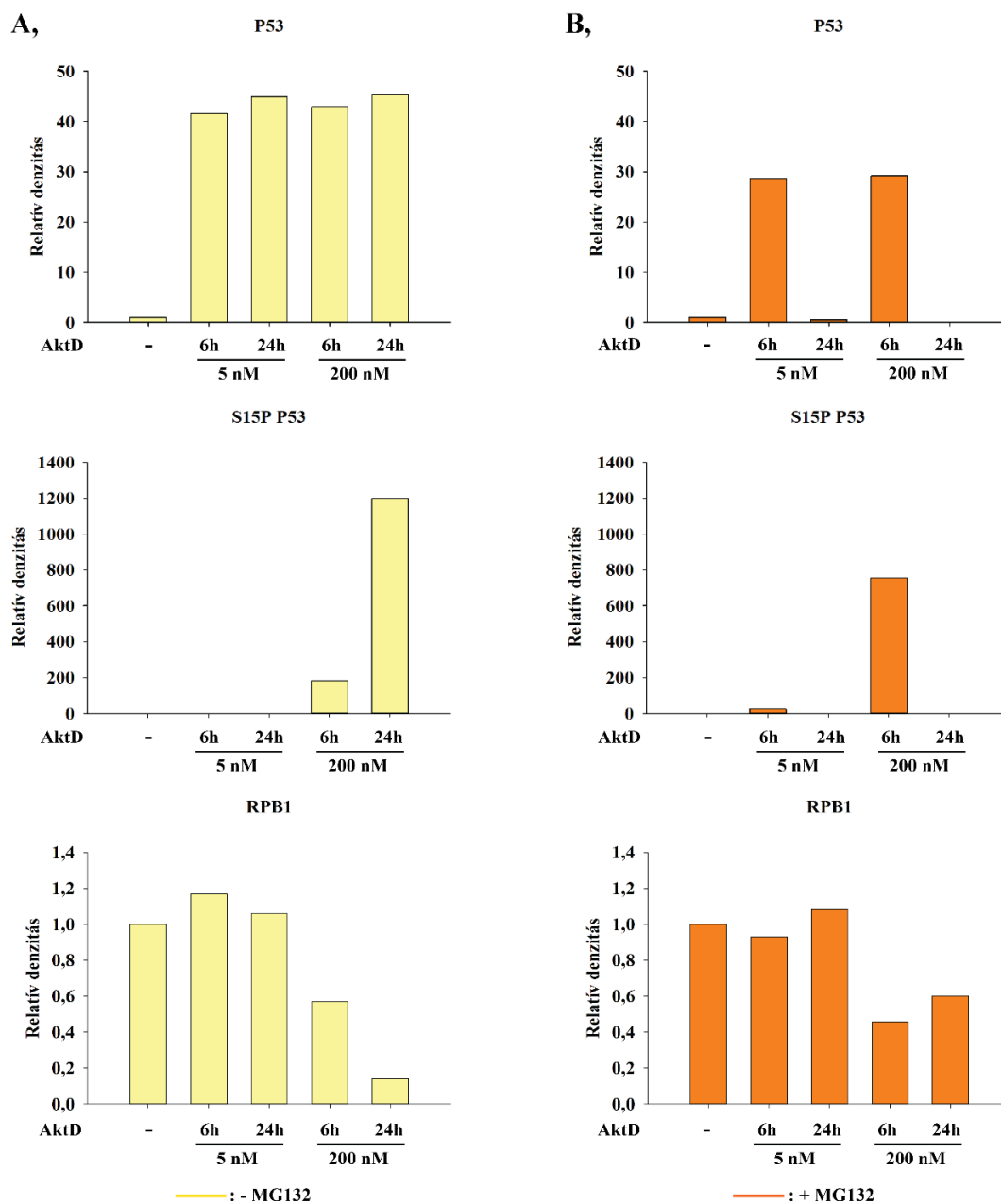
Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy a P53 globális fehérje szintjében nagy mértékű növekedés, míg az RPB1, az S2P RPB1, valamint az S5P RPB1 szintjében csökkenés figyelhető meg AktD kezelést követően. Ezen kívül kimutattuk, hogy az S2P RPB1 ubiquitilációjában a P53 fehérjének szerepe van a transzkripció leállításakor. Ezt követően



**27. ábra** A P53 fehérje szintje nő, míg az RPB1 szintje csökken magas koncentrációjú AktD kezelés hatására; az RPB1 szintjében bekövetkező csökkenés proteozómális degradáció következménye

A P53, az S15P P53, az RPB1, az S2P RPB1 és az S5P RPB1 fehérjék Western blot detekciója 6, illetve 24 órával 5 nM, illetve 200 nM AktD kezelést követően MG132 proteaszóma inhibitor hiányában (ábra bal oldala), valamint MG132 proteaszóma inhibitor jelenlétében (ábra jobb oldala).

Western blottal vizsgáltuk, hogyan változik a P53 és az RPB1 különböző formáinak fehérje szintje 5 és 200 nM AktD kezelés után 6 és 24 órával a 26S proteaszóma gátlásakor (27. ábra). Ezen kívül tanulmányoztuk, hogy a P53 Ser-15 foszforilált formája (S15P P53) kimutatható-e a vizsgált mintákban, mely a kettős-szálú DNS törések, illetve transzkripció elongációs blokk esetén figyelhető meg. Kísérletünkben azt tapasztaltuk, hogy MG132 proteaszóma inhibitor és 200 nM AktD együttes alkalmazása után 24 órával az S2P RPB1 esetében nem figyelhető meg a kontroll kísérlettel megegyező fehérje szint csökkenés. Az S5P RPB1 esetében ugyanezt tapasztaltuk 5 nM 24 órás, valamint 200 nM 6 és 24 órás kezelés után. Az RPB1 esetében a 200 nM AktD kezelés olyan nagy mértékű fehérje szint csökkenést eredményezett, hogy proteaszóma gátlást követően, bár jelentős emelkedést tapasztaltunk, nem érte el az alapállapotnál megfigyelt szintet. Ezzel ellentétben, MG132 kezelést követően a P53 fehérje szintjében 5 nM és 200 nM AktD kezelés után 24 órával nagy mértékű csökkenés következett be, míg 6 óránál nem történt változás (27. ábra).

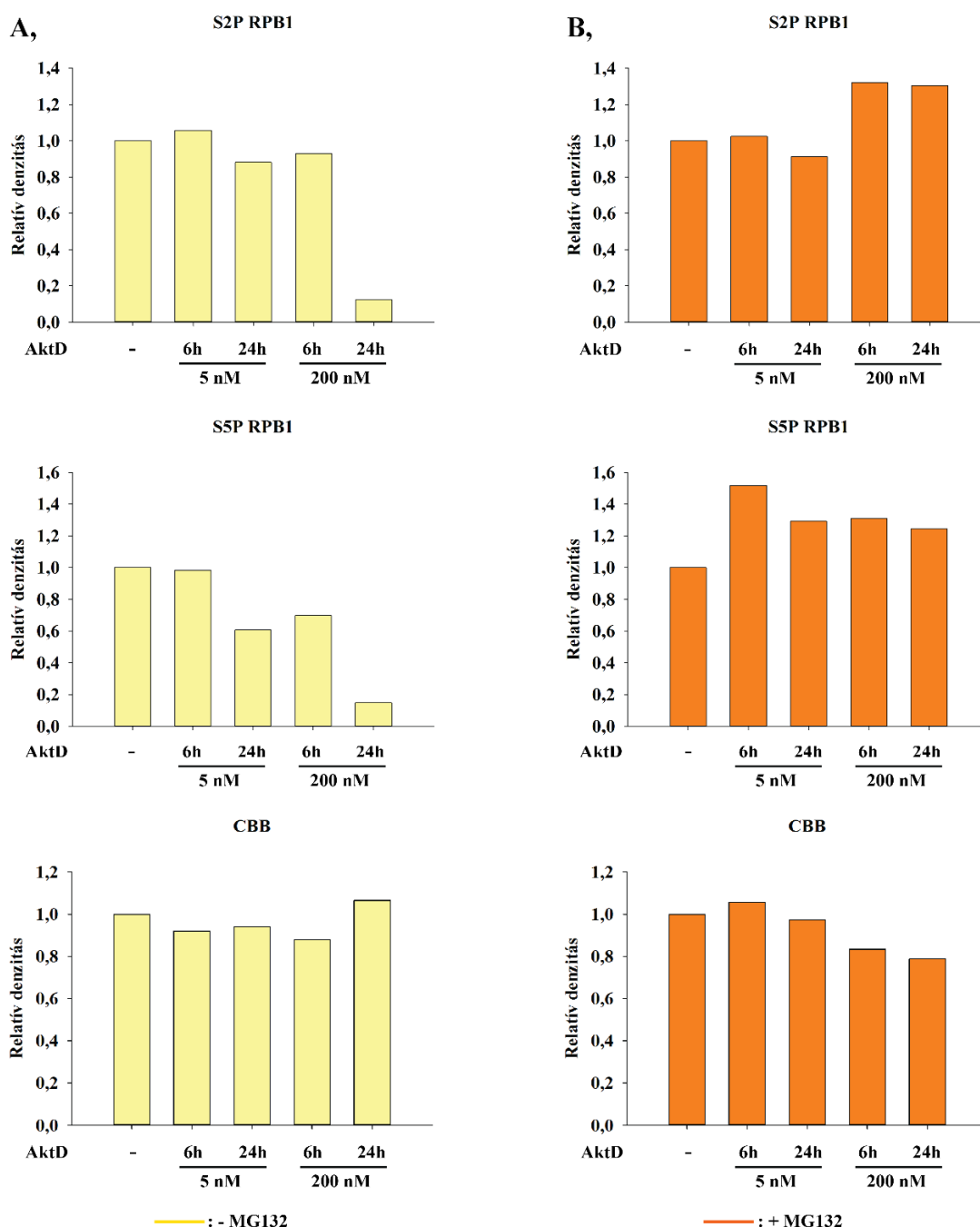


## 28. ábra A 27. ábra kiértékelése

A 27. ábrán látható Western blot kiértékelése Fiji (Image J) szoftver segítségével.

Ugyanezt figyelhetjük meg az S15P P53 esetében is, melynek szintje emelkedett magas koncentrációjú AktD kezelést követően, a proteasóma normál működése esetén. Ez alátámasztja, hogy a P53 S15P poszttranszlációs módosítása transzkripció elongációs blokk, illetve kettős-szálú DNS törés hatására következik be. Azonban a proteasóma gátlásakor, 24 órával 200 nM AktD kezelés után az S15P P53 fehérje szintje jelentősen

lecsökkent. Coomassie brilliant blue (CBB) festéssel igazoltuk a fehérje minták egységes felvitelét a gélre (**27. ábra**). A Western blot kiértékelése a **28.** és a **29. ábrán** látható.



## 29. ábra A 27. ábra kiértékelése

A 27. ábrán látható Western blot kiértékelése Fiji (Image J) szoftver segítségével.

Western blottal végzett kísérleteink alátámasztják korábbi eredményeinket, melyek azt mutatják, hogy a P53 fehérje szintje emelkedik, míg az RPB1 és annak S2P és S5P

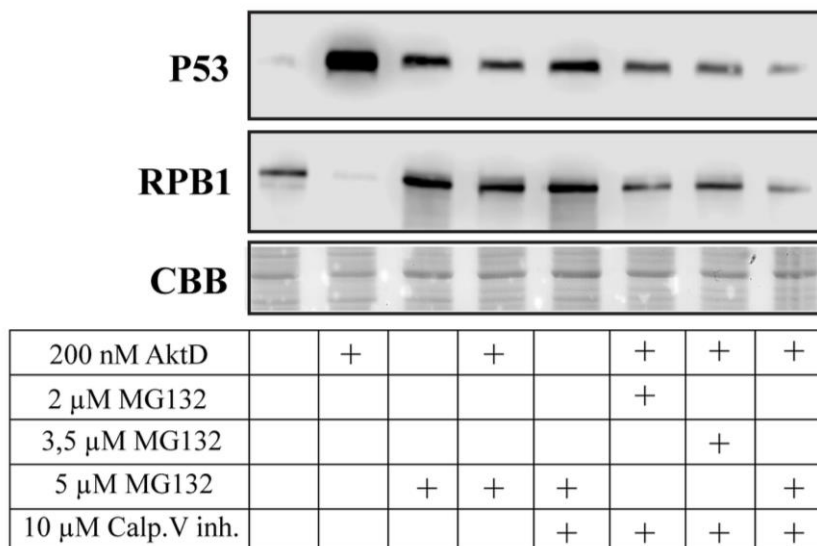
foszforilált formáinak szintje AktD kezelés hatására csökken. Eredményeinkből kiderül, hogy a P53 stabilizálódik, míg az RPB1 degradálódik transzkripció elongációs blokkot követően. Kimutattuk, hogy a transzkripció elongációjának blokkolásakor bekövetkező alacsony RPB1 szint a fehérje proteosómális degradációjának következménye. Másrészt a proteoszóma gátlását követő P53 fehérje szint csökkenés a transzkripció blokkolása esetén valószínűsíti a P53 proteoszóma-független degradációját.

#### **5.11. A P53 AktD és MG132 kezelést követő fehérje szint csökkenése nem a fehérje kalpain proteázok által szabályozott degradációjának következménye**

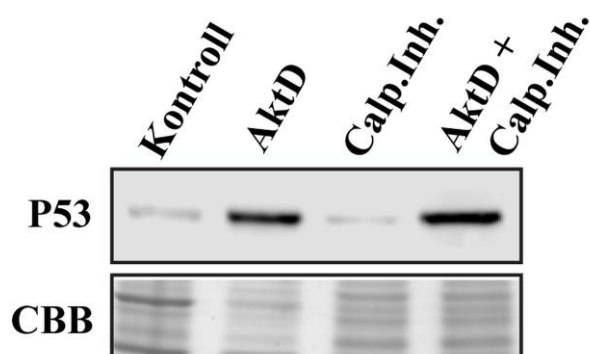
Az előzőekben kimutattuk, hogy a P53 fehérje szintje csökken 24 órával AktD és MG132 együttes kezelést követően. Mivel a P53 fehérje szintjében bekövetkező drasztikus csökkenés a proteoszóma gátlása esetén figyelhető meg, feltételeztük, hogy a P53 proteosómától független degradációja valósul meg. Korábban már kimutatták, hogy a P53 számos más útvonalon keresztül képes lebomlani, köztük a kalpain cisztein proteázok által (124,125). Ahhoz, hogy kiderítsük, kísérletünkben megfigyelt P53 fehérje szint csökkenés 24 órával AktD és MG132 együttes kezelését követően kalpainok által szabályozott degradáción keresztül valósul-e meg, Calpain V inhibitorral kezeltünk U2OS sejteket. Az eddigiekben alkalmazott 20  $\mu$ M MG132 a Calpain V inhibitorral együttesen alkalmazva toxikus volt a U2OS sejtekre, ezért csökkentettük az MG132 koncentrációját. Kísérletünkben 2; 3,5; illetve 5  $\mu$ M MG132-t alkalmaztunk 10  $\mu$ M Calpain V inhibitorral együtt, majd vizsgáltuk a P53 és az RPB1 fehérje szintjében bekövetkező változásokat transzkripció elongációs blokkot követően. Az MG132-t alacsonyabb koncentrációban (5  $\mu$ M) alkalmazva a P53 fehérje szintje nem csökkent olyan mértékben AktD kezelést követően, mint azt korábban tapasztaltuk 20  $\mu$ M MG132 esetében. Meglepő módon a Calpain V inhibitor hozzáadását követően a P53 fehérje szintje tovább csökkent az MG132 koncentrációjának emelésével transzkripció elongációs blokkot követően. Ezen kívül az RPB1 fehérje szintjében sem következett be olyan mértékű emelkedés, amelyet csak MG132 kezelést követően tapasztaltunk, ami arra utalhat, hogy a Calpain V inhibitor valamilyen módon csökkentheti az MG132 hatását (**30. A ábra**). Ahhoz, hogy kiderítsük, a kalpainok szerepet játszanak-e a P53 degradációjában stresszmentes körülmények között és transzkripciós blokkot követően, Calpain V inhibitorral kezeltünk U2OS sejteket, és vizsgáltuk a P53 fehérje szint változását AktD kezelést követően, illetve anélkül (**30. B ábra**). Eredményeink azonban azt mutatják, hogy a kalpain fehérjék nincsenek hatással a

P53 degradációjában az általunk vizsgált körülmények között. Feltehetően valamilyen más, proteasómától független útvonalon keresztül degradálódik a P53 AktD és MG132 kezelés együttes alkalmazásakor.

**A,**



**B,**



**30. ábra A P53 AktD és MG132 kezelést követő degradációra nem kalpain által szabályozott útvonalon keresztül valósul meg**

**A,** A P53 és az RPB1 fehérje szintjében bekövetkező változások 200 nM 24 órás AktD, illetve 2; 3,5; 5  $\mu$ M MG132, valamint 10  $\mu$ M Calpain V inhibitor alkalmazása esetén. **B,** A P53 fehérje szintje 24 órával 200 nM AktD és/vagy 10  $\mu$ M Calpain V inhibitor kezelés után.

## 6. Eredmények megvitatása

A transzkripció elongációs szakaszának blokkolása gyakran vezet kettős-szálú DNS töréshez is, melyet a sejt különböző javító mechanizmusok aktiválásával képes kijavítani (44). Az AktD által indukált transzkripció elongációs blokk következtében kialakuló kettős-szálú törések helyére RPA fehérjék kötődnek, aminek a hatására ATR kináz aktiválódik, mely ezt követően foszforilálja a P53-at S15 aminosaván (129,130). A p300 acetiltranszferáz a leállt RNSPII-höz kötődik, majd acetilálja a P53-at annak 382-es lizin aminosaván (132). Ezzel a P53 aktiválódik és stabilizálódik, ami lehetővé teszi a transzkripciós stresszválaszban részt vevő gének aktiválódását (130,131). A P53 feltehetőleg más útvonalon keresztül is szerepet játszik a transzkripció elongációs szakaszában. Korábban, élesztő heterológ rendszerben vizsgálták a P53 és az RNSPII kapcsolatát, azonban humán rendszerben, a transzkripció elongációs blokk tekintetében ezt az eddigiekben még nem kutatták (140,141). Munkám során humán sejtekben vizsgáltuk a P53 transzkripció elongációban betöltött szerepét AktD-vel indukált transzkripció elongációs blokkot követően. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy a P53 kölcsönhat az RNSPII legnagyobb alegységének, az RPB1-nek transzkripciósan aktív formáival (S2P RPB1 és S5P RPB1). Ezt alátámasztja egy nemrégiben megjelent publikáció is, melyben krio-elektronmikroszkópos és röntgen komputer-tomográfias kísérletekkel igazolták, hogy a P53 kölcsönhat az RNSPII RPB1 és RPB2 alegységeivel is (165). Ezentúl eredményeink bizonyítják, hogy stresszmentes körülmények között a P53 transzkripciósan aktív gének különböző régiójában jelen van, valamint hogy magas koncentrációjú AktD-vel indukált transzkripció elongációs blokk hatására a P53 erőteljesebb kötődést mutat a vizsgált gén régiókban. Ezzel ellentétben az RPB1 mintázata jelentős mértékben csökken 6 órával AktD hozzáadását követően.

Az AktD különböző molekuláris útvonalakat aktiválhat a koncentráció függvényében. Alacsony koncentrációban (5 nM) alkalmazva az egyik jól ismert MDM2 inhibitor, a nutlin-3 hatását mimikálja azáltal, hogy az RNSPI által végzett rRNS szintézist negatívan szabályozza, ami szabad riboszómális fehérjék (pl. L11, L23) felhalmozódásához vezet, melyek ezután kölcsönhatnak az MDM2 fehérjével és gátolják annak aktivitását (62,63,65,76). Ezzel ellentétben az AktD-t magas koncentrációban (200 nM) alkalmazva a transzkripció elongációs szakaszának gátlását eredményezi, ami egyes esetekben kettős-szálú DNS törést okozhat (166-168). Korábban kimutatták, hogy az AktD kezelés és az



UV sugárzás az elongáló RNSPII gátlásán keresztül a transzkripció elongációs szakaszában történő leálláshoz vezethet (169,170).

Kísérleteinkből kiderül, hogy az AktD kis mértékben hatással van a U2OS sejtek sejciklusának eltolódására. Kimutattuk, hogy a G1 fázisban lévő sejtek száma csökkent, míg a G2 fázisban lévő sejtek száma emelkedett AktD kezelést követően. Az S fázisban lévő sejtek számában magas koncentrációjú AktD hatására nem figyeltünk meg változást. Ezzel ellentétben alacsony dózisú AktD kezelést követően 6 órával emelkedett, míg 24 órával a kezelés után csökkent az S fázisban lévő sejtek száma. Eredményeink összefüggésbe hozhatóak korábbi, HCT116 sejtekben mért adatokkal. HCT116 sejtekben kimutatták, hogy alacsony koncentrációjú AktD kezelést követően az S fázisú sejtek száma csökken az idő függvényében, ami a sejtek G1 fázisban történő felhalmozódásához vezetett (62). Mivel az MDM2 ubiquitin ligáz aktivitásának gátlása a P53 fehérje felhalmozódásához vezet, ennek következtében P53-függő útvonalak aktiválódnak, mint a sejciklus G1-, illetve G2-fázisban történő felfüggesztése. Az általunk végzett kísérletben az AktD feltehetőleg P53-által szabályozott, G2 fázisban történő leállást indukált. Ezen kívül vizsgáltuk, hogy az AktD U2OS sejtekre gyakorolt toxicitása a sejtek apoptózist indukálja-e. Eredményeink alapján azonban a Sub-G1-ben lévő sejtek számában nem figyelhetünk meg jelentős változást a kezeletlen kontrollhoz képest.

A kettős-szálú DNS törést javító mechanizmus (DSBR) és az UV sugárzás hatására történő nukleotid excíziós repair (NER) során az elongáló RNSPII egy időre leáll, majd az előbbi két folyamat aktiválhatja az RNSPII ubiquitilációját és lebomlását is (24,149,151). Az UV sugárzás hatására bekövetkező transzkripciós blokk a P53 bizonyos aminosavain történő poszttranszlációs módosítások (S15P, K382ac) hatására a fehérje aktivációjához vezet, ami a DNS hibajavító fehérjék kötődését indukálja a keletkezett DNS-léziókhoz, ezáltal elősegíti a genom stabilitás helyreállítását és a tumorok kialakulásának valószínűségének csökkenését (129). Eredményeink azt mutatják, hogy a P53 részt vesz ebben a folyamatban, mivel AktD-vel indukált transzkripciós blokk hatására a P53 foszforilálódik Ser-15 aminosaván, ezáltal a P53 stabilizálódik és feltehetőleg szerepet játszik a DSBR során.

Eredményeinkből kiderül, hogy transzkripció elongációs blokkot követően a P53 lokalizálódik az S2P és az S5P RPB1-gyel, valamint ez a lokalizáció 24 órával magas koncentrációjú AktD kezelést követően egyedi sejtmagi fókuszokra korlátozódik, feltehetőleg azokra a helyekre, ahol a DNS-t károsodás érte. Ezen kívül kimutattuk, hogy

magas koncentrációjú AktD hatására a P53 ko-lokalizálódik a  $\gamma$ H2AX-szel, azonban sem az S2P RPB1, sem az S5P RPB1 nem mutat ko-lokalizációt a  $\gamma$ H2AX-szel. Kísérleteink alátámasztják, hogy az AktD kezelés következtében keletkező kettős-szálú DNS törések helyén nincs aktív transzkripció, valamint feltételezhetjük, hogy a P53-nak szerepe van a törés helyén történő RNSPII degradációban, mellyel hozzájárul ahhoz, hogy a DNS hibajavító faktorok hozzáférjenek a keletkezett léziókhoz. Ezen kívül kimutattuk, hogy a P53 kölcsönhat az RPB1 transzkripciósan aktív formáival (S2P RPB1 és S5P RPB1) stresszmentes körülmények között és transzkripció elongációs blokk indukálása esetén is. Eredményeink összefüggésbe hozhatók a korábban *Caenorhabditis elegans*-ban tapasztaltakkal: a transzkripció gátlásakor az RNSPII kromatin „degradációs központok”-ban helyezkedik el, ami maga után vonja a fehérje proteoszómális lebontását (171).

Kimutattuk, hogy P53 hiányában, magas dózisú AktD hatására az S2P RPB1 ubiquitilációja csak részben játszódik le, ami azt mutatja, hogy a P53-nak szerepe van az RNSPII ubiquitilációjának szabályozásában és proteoszómális lebontásában a transzkripció leállásakor. Ezek alapján elmondható, hogy a P53-nak szerepe van a transzkripció elongációjában, és annak leállása esetén a P53 aktiválja a RNSPII komplex nagy alegységének lebontását, így sejtes védekező mechanizmusok aktiválásában is részt vehet.

Stresszmentes körülmények között a sejteknek nincs szüksége nagy mennyiségű P53 fehérje jelenlétére, ezért a P53 ubiquitilálódik, majd a 26S proteoszóma segítségével lebomlik (73,74). Ebben a folyamatban különböző E3 ubiquitin-ligáz enzimek (MDM2, PIRH2 és COP1) vehetnek részt (172). Emellett a P53 más útvonalakon keresztül is degradálódhat, mint például sejtmagi cisztein proteázok, kalpainok által szabályozott folyamatban (73,173,174). Kísérleteinkben AktD és MG132 proteoszóma inhibitor egyidejű alkalmazása után 24 órával a P53 és annak Ser-15 foszforilált formájának fehérje szintje csökkent, míg az RPB1 szintje közel megegyező volt a kezeltlen kontrollhoz képest. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy transzkripciós blokk esetén a proteoszóma jelenléte szükséges a P53 aktivációjához. A P53 aktivációja valószínűleg nem csökken le teljesen transzkripciós blokkot követően, mivel hasonló P53 fehérje mennyiséget mutattunk ki 6 órával MG132 hozzáadását követően, és anélkül is. Feltehetőleg a P53, az RPB1-gyel ellentétben, eddig még nem tisztázott, proteoszóma-független módon degradálódik transzkripció elongációs blokkot követően. Amennyiben az alacsony P53 fehérje szint 24 órával AktD és MG132 kezelést követően a fehérje degradációjának következménye, ez a folyamat a proteoszómától független módon valósul meg.

Feltételezésünk volt, hogy a P53 kalpain-mediált útvonalon keresztül degradálódik, ezért vizsgáltuk, hogyan változik a P53 fehérje szintje AktD és Calpain V inhibitor együttes alkalmazása esetén, azonban nem tapasztaltunk változást a fehérje szintjében. Ugyanez érvényesül abban az esetben is, amikor AktD-t, MG132-t és Calpain V inhibitor együttesen alkalmaztunk. Megfigyeléseink azt mutatják, hogy a transzkripció elongációs szakaszában történő leállásakor a proteoszóma szerepet játszik a P53 aktivációjában.

Korábban már publikált, kezeletlen U2OS sejteken végzett ChIP-seq adatok kiértékelésével a vizsgált géneket a P53 mintázata alapján három csoportra különítettük (160,161). Ezek alapján megfigyelhető P53 és RPB1 kötődése a promóter környékén (1. géncsoport), valamint az egész transzkripciós egységen (2. géncsoport). A 3. géncsoportban a P53 kötődése elhanyagolható volt. A ChIP-seq adatok alapján a P53 kötődése megfigyelhető a magas expressziójú gének régióiban, amit kromatin immunprecipitációs kísérlettel is alátámasztottunk általunk választott géneken: *ActB*, *Cdk12*, *Brat1* és *Sdcbp*. Eredményeink összhangban vannak korábbi vizsgálatokkal, melyeket élesztő heterológ rendszerben végeztek. Élesztő modellorganizmusban kimutatták, hogy a humán P53 kötődik olyan gének kódoló régiójához, melyek promóter régiójukon és attól disztális szakaszokon sem tartalmaznak P53 kötőhelyeket (140). Kísérleteinkben humán sejtekben vizsgáltuk a P53 és az RPB1 kötődését a fentebb említett génszakaszokon stresszmentes körülmények között, és transzkripció elongációs blokk indukálása után 6 és 24 órával. A P53 mennyiségi eloszlásában emelkedést figyelhetünk meg 6 és 24 órával transzkripciós blokk indukcióját követően, míg az RPB1 kötődésében 6 óránál nagy mértékű csökkenést tapasztaltunk, majd 24 órával AktD kezelést követően visszaállt az eredeti szinthez közeli értékre. Azonban az *ActB* gén esetében a P53 és az RPB1 hasonló mintázatot mutat a vizsgált régiókban.

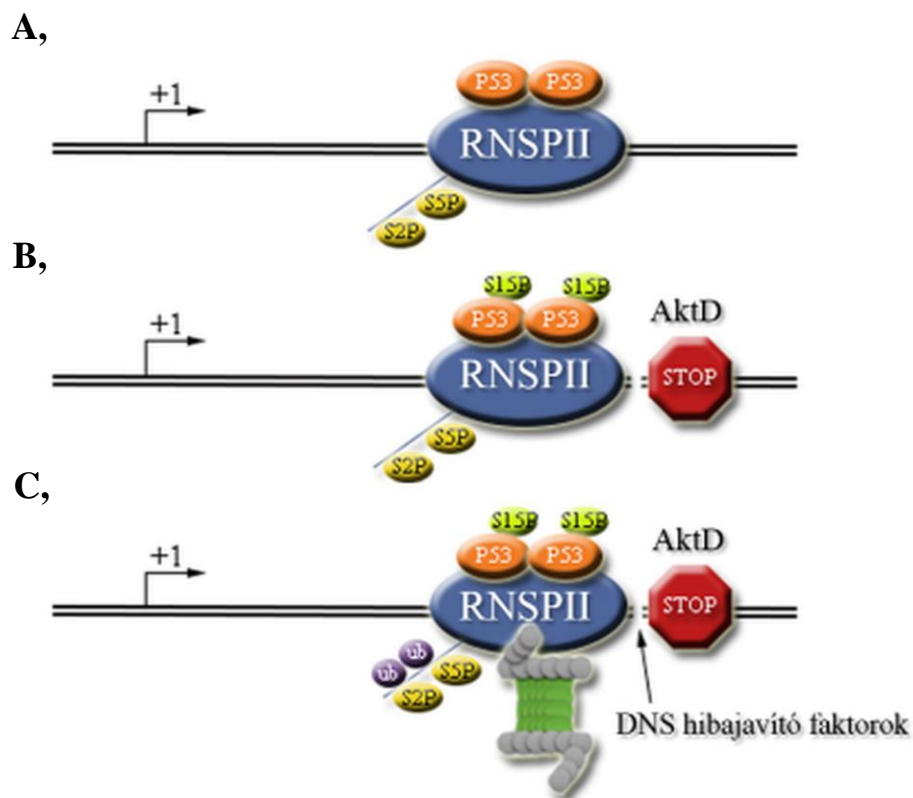
A kromatin immunprecipitáció során kapott eredményeink összhangban vannak azzal, amit a TUBE-pull-down kísérletben mutattunk ki transzkripció elongációs blokk indukciója esetén: 6 órával AktD kezelést követően az ubiquitilált RPB1 szintje jelentősen megemelkedett, emellett az RPB1 kromatinhoz való kötődése csökkent. 24 órával a kezelést követően az ubiquitilált RPB1 mennyisége kevesebb volt, mint amit 6 óránál figyeltünk meg, ami összefüggésbe hozható a kromatinon megfigyelhető emelkedett RPB1 kötődéssel. Ez alapján feltételeztük, hogy az elongáló RPB1 a transzkripció elongáció blokkolásakor nem tud továbbhaladni a DNS-en, ami akadályozza a hibajavító faktorok hozzáférését a sérült DNS-hez. Ennek feloldására a 26S proteoszóma degradálja az RPB1-

et, hogy a hibajavító faktoroknak hozzáférést biztosítson a károsodott DNS kijavításához. Ezen kívül eredményeink rávilágítanak arra, hogy transzkripció elongációs blokkot követően a P53-nak is szerepe van az RPB1 ubiquitin-függő lebontásában. Mindezek összhangban vannak korábbi megfigyeléseinkkel, melyek azt mutatják, hogy az RPB1 és a P53 specifikus sejtmagi fókuszokban ko-lokalizálnak 24 órával AktD kezelés után. Kísérleteinkből arra következtethetünk, hogy a transzkripció elongációs blokk hatására leállt RNSPII speciális degradációs helyeken jelenik meg a kromatinon a P53 közreműködésével. Összeségében elmondható, hogy humán sejtekben a P53 feltehetőleg együtt halad az elongáló RNSPII-vel és a transzkripció elongáció blokkolásakor a P53 kromatinon megfigyelt kötődése nagyobb mértékű, ami segíti a leállt RNSPII ubiquitin-függő eltávolítását a kromatinról, hogy hozzájáruljon a hibajavító faktorok hozzáféréséhez a károsodott DNS-en.

Munkám során kimutattuk, hogy a humán P53 kölcsönhat az RNSPII legnagyobb alegységével, az RPB1-gyel, valamint annak iniciációra (S5P RPB1) és elongációra (S2P RPB1) jellemző formájával is, ami részben alátámasztja, hogy a transzkripció során a P53 együtt halad az elongáló RNSPII-vel. A transzkripció elongációs szakaszában történő leállása esetén a P53 és az RPB1 különböző eloszlást mutat a vizsgált kromatin régiókon: a P53 kötődése emelkedik, míg az RPB1 mintázatában csökkenést figyelhetünk meg. Ezek az eredmények arra utalhatnak, hogy humán sejtekben a P53 RNSPII-vel alkotott kölcsönhatásán keresztül valamilyen módon szabályozhatja a transzkripció elongáció folyamatát. Korábban már kimutatták, hogy az RPB1 S2P hiperfoszforilált formájában DNS károsodás hatására bekövetkező szerkezeti változások hozzájárulnak az elongáló RNSPII ubiquitin-függő proteosómális lebontásához (50,164). UV sugárzás hatására bekövetkező DNS károsodások esetén az RPB1 hiperfoszforilációja miatt nem tud kialakulni újabb pre-iniciációs komplex (PIC), ezáltal a sejt elkerüli egy esetleges hibás transzkripció végbemenetelét, mely tumorok kialakulásához is vezethetne (58,162). Továbbá kimutatták, hogy a transzkripciós blokk az RPB1 ubiquitin-függő degradációjához vezet (24). Dolgozatomban kimutattuk, hogy humán sejtekben transzkripciós blokkot követően az elongáló RPB1 lebomlása 26S proteoszóma-függő, valamint P53 által szabályozott folyamat.

Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a P53 transzkripciós elongációs faktorként is működhet humán sejtekben, feltehetőleg az elongáló RPB1-gyel kialakított kölcsönhatásán keresztül. Ezen kívül dolgozatomban leírt adatok rámutatnak, hogy a transzkripció

elongációs szakaszának leállásakor a P53-nak jelentős szerepe van az RPB1 egy adott transzkripciós egységen történő ubiquitin-függő proteozómális degradációjában, ami hozzájárul a hibajavító faktorok DNS-hez történő hozzáféréséhez (**31. ábra**). Eredményeink egy újfajta megvilágításba helyezik, hogyan tudják a sejtek a különböző stresszhatásokra bekövetkező transzkripció elongációs blokkot feloldani.



**31. ábra A P53 és RNSPII közti kölcsönhatás és a transzkripció elongációs blokk kapcsolatának sematikus modellje dolgozatomb alapján**

**A,** Alapállapotban a P53 kölcsönhat az elongáló RNSPII-vel. **B,** Magas koncentrációjú AktD hatására transzkripció elongációs blokk, majd ennek következtében kettős-szálú DNS törés következik be. A P53 Ser-15 aminosaván foszforilálódik, mely hozzájárul a fehérje aktiválódásához és stabilizálódásához is. **C,** AktD-vel indukált transzkripció elongációs blokk esetén az RNSPII ubiquitilálódik, mely folyamatban a P53 is részt vesz. Ezt követően a proteozóma, feltehetőleg a sérülés helyén, degradálja az elongáló RNSPII-t, hogy teret engedjen a DNS hibajavító faktoroknak a keletkezett DNS sérülések kijavításához.

## 7. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Boros Imre Miklósnak, aki lehetőséget biztosított számomra, hogy szakdolgozóként, és később PhD hallgatóként a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszéken dolgozhassak, valamint mindvégig támogatott és szakmai tudásával nagy mértékben segítette munkámat.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Pankotai Tibornak, aki rengeteg segítséget és szakmai támogatást nyújtott, amivel szakmai tudásomat és kísérletes munkámat bővíthettem.

Köszönöm Majoros Hajnalkának, Huliák Ildikónak és Dr. Újfaludi Zsuzsannának, hogy kísérletes munkájukkal és támogatásukkal segítették előrehaladásomat.

Köszönöm Ökrösné Katinak és Pataki Edinának a sejtenyészti laboratóriumban nyújtott segítségüket, valamint hogy mindvégig támogattak és segítettek munkámat.

Köszönöm Dr. Gyenis Ákosnak a ChIP-seq adatok kiértékelésében nyújtott segítségét és Pukler Péternek, egykori szakdolgozómnak, a ChIP kísérletekben történő együttműködését.

Hálás vagyok Dr. Hermes Editnek, akinek mindig számíthattam segítségére és támogatására.

Hálás vagyok a Genetika Tanszéknek, hogy a Tanszéken lévő konfokális mikroszkóp alkalmazását lehetővé tették számomra.

Köszönettel tartozom Édesanyámnak, hogy mindvégig mellettem állt, biztatott és támogatott a PhD fokozat megszerzéséig vezető hosszú, rögös úton. Köszönöm Nagyszüleimnek, akik sajnos már nem lehetnek velem, de a velük töltött évek során nagy szeretetükkel támogattak és szorgalmazták továbbtanulásomat, mellyel jelentősen hozzájárultak ahhoz, hogy idáig eljutottam.

Köszönöm páromnak, Páhi Zoltánnak, hogy segített túllépni a nehezebb időszakokon, valamint megértésével mindvégig támogatott.

Köszönöm párom Édesanyjának, hogy biztatásával és megértésével segített abban, hogy túllendüljek a nehezebb időszakokon.

## 8. A doktori értekezés összefoglalója

A P53 alapállapotban alacsony szinten van jelen a sejtekben, azonban stabilizációját és ezáltal a fehérje szintjének emelkedését számos stresszhatás (hősokk, hidegsokk, UV sugárzás, ionizáló sugárzás, hipoxia, tápanyaghiány, stb.) kiválthatja (98-103). Stresszmentes körülmények között a P53 fehérjét az MDM2 ubiquitin ligáz ubiquitilálja, ezáltal proteasómális degradációra jelöli ki (73,74). DNS károsodást követően az MDM2 ubiquitilálódik, majd a proteasómában lebontásra kerül, ezáltal a P53 felszabadul annak gátlása alól. Ezután a P53 felhalmozódik a sejtmagban, miközben foszforilációs és acetilációs lépéseken keresztül aktiválódik (67,68,75,76). A P53 tetramerként kötődő transzkripciós faktorként számos gén (pl. *Bax*, *Noxa*, *Puma*, *P21*) promóter régiójában található, specifikus konszenzus szekvencia részletekhez kötődve aktiválja azok transzkripcióját (67-69). Ezáltal a P53 számos, nélkülözhetetlen biokémiai folyamatban fontos szabályozó szerepet tölt be, mint az apoptózis indukciója, a sejtciklus felfüggesztése, illetve a transzkripció szabályozása (67,68,75-77). DNS károsodás hatására a P53 a *P21* gén promóter régiójához kötődve indukálja annak transzkripcióját, melyről átíródó ciklin-dependens kináz inhibitor a DNS hibajavítás idejére a sejtciklus leállítását szabályozza. Amennyiben a DNS károsodás olyan nagy mértékű, hogy már nem lehet javítani, a P53 a pro-apoptotikus gének transzkripcióját aktiválja, így hozzájárul a genom integritás fenntartásához, mivel megakadályozza a károsodott DNS utód sejtekbe jutását (71,72).

A közelmúltban élesztő heterológ rendszerben végzett kísérleti eredmények arra utalnak, hogy a P53 transzkripció elongációs faktorként is képes működni olyan géneken, melyek nem tartalmaznak P53 kötőhelyeket (140). A P53 ezekhez a génekhez feltehetőleg az elongáló RNSPII-vel alkotott kölcsönhatásán keresztül kötődik, azonban ennek pontos mechanizmusa humán sejtekben még nem ismert (141). Ezen kívül laboratóriumunkban korábban kimutattuk, hogy a DmP53 (*Drosophila melanogaster* P53) a politén kromoszómákon a transzkripciósan aktív régiókban helyezkedik el, valamint ezt az RPB1 CTD foszforilációs állapota nagy mértékben befolyásolja (175).

Dolgozatomban humán sejt kultúrán vizsgáltuk a P53 transzkripció elongáció során betöltött funkcióját. Tanulmányoztuk a P53 és az RNSPII közti kapcsolatot alapállapotban és AktD-vel indukált transzkripció elongációs blokk esetén is. Ezen kívül megvizsgáltuk a P53 kötődését olyan transzkripciósan aktív génszakaszokon, melyek nem tartoznak a P53

célgénjei közé. A P53 és az RNSPII eloszlását alapállapotban és transzkripció elongációs blokkot követően is analizáltuk a vizsgált génszakaszokon. Továbbá tanulmányoztuk, hogy az AktD kezelés hogyan befolyásolja az RNSPII és a P53 fehérje szintjét, valamint sejten belüli elhelyezkedését.

Kísérleteinkben eltérő AktD koncentrációkat alkalmazva más-más stressz útvonalak aktiválódását idéztük elő. Az AktD alacsony koncentrációban a nutlin-3 MDM2 inhibitor hatását mimikálja, ami a riboszómális fehérjék felhalmozódását eredményezve gátolja az MDM2 E3-ubiquitin ligázt. Ezt követően a P53 fehérje szintje emelkedik a sejtekben, ami a *P21* transzkripcióját indukálva P53-függő útvonalak aktiválódásához vezet (62,63,65,76). Ezzel ellentétben az AktD magas koncentrációban transzkripció elongációs blokkot indukál, aminek következtében kettős-szálú DNS törések is kialakulhatnak. A kettős-szálú DNS törések helyére RPA fehérjék kihorgonyozzák az ATR kinázt, amely Ser-15 aminosaván foszforilálja, ezáltal aktiválja a P53 fehérjét (166-168).

Kísérleteink során vizsgáltuk, hogy az AktD alacsony (5 nM), illetve magas koncentrációban (200 nM) okozza-e a sejtciklus fázisainak eltolódását. Azt tapasztaltuk, hogy AktD kezelés hatására a G1 fázisban levő sejtek száma csökkent, míg a G2 fázisban lévő sejtek száma emelkedett. A G2 fázisban kimutatott emelkedett sejtszám a sejtciklus G2 fázisban történő leállítására utalhat, aminek következtében kevesebb G1 fázisú sejtet figyeltünk meg. Végül az S fázisú sejtek számában csak alacsony dózisú AktD esetében és 24 órával a kezelés után tapasztaltunk csökkenést.

Kimutattuk, hogy AktD kezelés hatására az RPB1 szintje csökkent, míg a P53 fehérje szintje emelkedett, és a magas koncentrációjú AktD kezelést követően a fehérje aktiválódását eredményezte. Az RPB1 fehérje szintjében főként 24 órával magas koncentrációjú AktD kezelés hatására figyelhető meg jelentősebb csökkenés, amely az iniciációra jellemző S5P RPB1 és az elongációra jellemző S2P RPB1 esetében is kimutatható.

Eredményeink azt mutatják, hogy a P53 és az RPB1 AktD kezelés hatására ko-lokalizálódik egymással. Az S2P RPB1 és az S5P RPB1 24 órával 200 nM AktD kezelést követően egyedi nukleáris fókuszokban jelentek meg, mely egybeesik a P53 sejten belüli elhelyezkedésével. Ez arra utal, hogy 24 órával magas koncentrációjú AktD kezelést követően a két fehérje ko-lokalizációja egyedi sejtmagi fókuszokra korlátozódik. Ezen kívül kimutattuk, hogy a P53 AktD kezelést követően ko-lokalizálódik a  $\gamma$ H2AX-szel, az



S2P és az S5P RPB1 viszont nem mutatott ko-lokalizációt a  $\gamma$ H2AX-szel. Ebből arra következtethetünk, hogy az AktD hatására bekövetkező transzkripció blokk következtében keletkező kettős-szálú DNS törések helyén nincs aktív transzkripció, mely elősegíti a hibajavító faktorok könnyebb hozzáférését a károsodott DNS-hez. A P53 fehérjének feltehetőleg szerepe van az elongáló RNSPII DNS-ről történő eltávolításában transzkripció blokkot követően. Kísérleteink során kimutattuk, hogy a P53 kölcsönhat az RPB1 S2P és S5P formáival mind stresszmentes körülmények között, mind pedig AktD kezelést követően.

Kísérleteink azt mutatják, hogy a P53 a transzkripcióan aktív génszakaszokhoz is kötődik és a transzkripció elongációs blokk további P53 fehérjék kötődését eredményezi. ChIP-seq kísérletből származó adatok analízisével három egyedi géncsoportot különítettünk el. Az 1. géncsoportba olyan géneket soroltunk, melyeknél a P53 kötődése a TSH körül figyelhető meg, a 2. géncsoportra jellemző, hogy a P53 kötődése a gének átíró régióira korlátozódik, míg a 3-as géncsoportba azok a gének sorolhatók, melyeken nem találtunk P53 fehérjét. A ChIP-seq adatok alapján elmondható, hogy a kötött P53 fehérje mennyisége és a gének expressziójának mértéke összefüggésben van egymással, mivel a P53 főként a magasan expresszáldó géneken figyelhető meg. Ebből kiindulva, ChIP kísérlettel vizsgáltuk a P53 és az RPB1 kötődését stresszmentes körülmények között és transzkripció elongációs blokkot követően az *ActB*, a *Cdk12*, a *Brat1* (1. géncsoport) és az *Sdcbp* (2. géncsoport) gének promóter, géntest és 3'UTR régiójában. Az RPB1 eloszlása főként a promóter és a Géntest 1 régióban figyelhető meg, mely 6 órával AktD kezelést követően jelentős mértékben lecsökken, 24 órával a kezelés után pedig kezd visszaállni. Ezzel ellentétben alapállapotban a P53 fehérje kötődése jelentősen lecsökken a vizsgált génszakaszok többségénél, majd AktD kezelés hatására a P53 fehérje szintje emelkedik a vizsgált génszakaszokon. Ez alól kivétel az *ActB* gén, ugyanis itt a P53 és az RPB1 hasonló eloszlást mutat.

Kísérleteink során kimutattuk, hogy az S2P RPB1 transzkripció elongációs blokk következtében ubiquitilálódik, ami P53-függő folyamat. A legtöbb ubiquitilált S2P RPB1 fehérje főként 6 órával AktD kezelés után figyelhető meg, míg 24 órával AktD kezelést követően kevesebb volt az ubiquitilált fehérje mennyisége. A P53 fehérje hiányában azonban a transzkripció blokkot követően megfigyelt ubiquitilált S2P-RPB1 fehérje mennyiségében nagy mértékű csökkenést tapasztaltunk. Ez összefüggésben van az S2P RPB1 fehérje szintjében tapasztalt változással is: P53 hiányában több S2P RPB1 fehérjét

figyelhetünk meg, mint P53 jelenlétében 24 órával AktD kezelést követően. Ez alátámasztja, hogy transzkripció elongációs blokkot követően a P53 fehérjének szerepe van az S2P RPB1 ubiquitilációjában. Ez összefüggésbe hozható a kromatin immunprecipitáció során kapott eredménnyel, melyek együttesen azt mutatják, hogy transzkripció elongációs blokk indukálása után 6 órával a P53 szerepet játszik a sérülés helyén megrekedt RPB1 ubiquitilációjában, aminek következtében a károsodott DNS hozzáférhetővé válik a hibajavító faktorok számára.

További kísérleteket végeztünk annak kiderítésére, hogy a transzkripció elongáció blokkolásakor bekövetkező RPB1 ubiquitilációt követően a fehérje proteosómális degradációja is megfigyelhető-e. Feltevésünk alátámasztására MG132 proteoszóma inhibitorral kezeltük a sejteket és vizsgáltuk, hogyan változik az RPB1 fehérje szintje AktD kezelés hatására. Az RPB1, valamint annak transzkripciósan aktív formáinak fehérje szintje közel megegyező volt a kezeletlen kontrollban tapasztalt RPB1 szinttel, ami egyértelműen jelzi, hogy a transzkripció elongációs blokk következtében leállt RPB1-et a 26S proteoszóma lebontja. Ezen kívül a P53, valamint annak S15P formájának fehérje szintjében csökkenést figyeltünk meg 24 órával AktD kezelést követően a proteoszóma funkciójának gátlásakor. Ebből arra következtettünk, hogy a P53 lebontása egy korábban már leírt, kalpain-útvonalon keresztül valósul meg, ezért Calpain V inhibitor kezelést követően vizsgáltuk a P53 fehérje szintjében bekövetkező változásokat (124,125). Azonban kísérleteink azt mutatják, hogy a P53 fehérje szintjében bekövetkező csökkenés 24 órával AktD kezelést követően a proteoszóma gátlásakor nem kalpain-függő útvonalon keresztül megy végbe.

Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a P53 olyan transzkripciósan aktív gének különböző szakaszain is megfigyelhető, melyek nem tartoznak közvetlen célgénjei közé. Ez a kötődés feltehetőleg az elongáló RNSPII-vel alkotott kölcsönhatásán keresztül valósul meg. Kísérleteink rámutatnak arra, hogy a P53 szerepet játszik a transzkripció elongációs szakaszában a transzkripció blokkolásakor is. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy a P53-nak szerepe van az RPB1 ubiquitin-függő proteosómális degradációjában transzkripció elongációs blokkot követően. A transzkripció elongációs szakaszában történő leállásakor a P53 feltehetőleg szerepet játszik a leállt RPB1 kromatinról történő eltávolításában, hogy ezáltal teret engedjen a hibajavító faktorok DNS-hez való hozzáférésehez. Eredményeim összességében egy újfajta rálátást biztosítanak arra, hogyan tudják a sejtek a különböző stresszhatásokra bekövetkező transzkripció elongációs blokkot feloldani.

## 9. Summary

Under normal cellular conditions, the tumor suppressor protein P53 is present in a low steady state level, while in response to stress conditions, such as temperature fluctuations, irradiations or hypoxia, it is stabilized (98-103). During normal circumstances, the P53 level is regulated by MDM2, which forms a complex with P53 and ubiquitylates it by this targeting P53 for proteasomal degradation (73,74). Different types of DNA damages induce the dissociation of the P53-MDM2 complex which leads to the nuclear accumulation of P53. Additionally, under stress conditions P53 is activated by different posttranslational modifications, such as phosphorylation and acetylation (67,68,75,76). Following its activation, P53 facilitates transcription by binding to consensus sequences at the promoter regions of its target genes (pl. *Bax*, *Noxa*, *Puma*, *P21*) (67-69). Additionally, P53 regulates various biochemical processes, such as cell cycle arrest, DNA repair or apoptosis (67,68,75-77).

Upon DNA damage, depending on the extend of the damage, P53 can activate different pathways: it can induce the expression of *P21*, which arrests the cell cycle at G1/S and G2/M allowing sufficient time for DNA repair. Upon serious DNA damage, however, P53 could also induce apoptosis by activating the transcription of pro-apoptotic genes (71,72).

Recent data in yeast heterologous system have indicated that human P53 might have a so far unrecognized role in the process of transcription elongation. In this function P53 acts as a transcription elongation factor on actively transcribed genes, which are not direct targets of it (140). Our previous results also showed that DmP53 (*Drosophila melanogaster* P53) was localized at transcriptionally active regions on the *Drosophila* polytene chromosomes and the phosphorylation state of RPB1 influenced P53 association to the chromatin (142). Based on these findings, we presumed that P53 binds to actively transcribed genes through its interaction with the elongating RNAPII. However, the exact mechanism and the functional consequences of the interaction between P53 and RNAPII in human cells are still unknown (141).

In my thesis work I studied the presumed novel role of P53 in the elimination of transcription blocks. In order to block transcription in human cultured cells, we used Actinomycin D (ActD) treatment. Depending on its dose, ActD can induce different molecular pathways. At low concentration (5 nM) it mimics the effect of MDM2 inhibitor nutlin-3, abolishing rRNA production by RNA polymerase I. This leads to the

accumulation of free ribosomal proteins that interact with and inhibit MDM2. Consequently the P53 protein level is increased in the cells, which then induces the transcription of *P21* leading to the activation of P53-dependent pathways (62,63,65,76). On the contrary, at high concentration (200 nM), ActD induces the inhibition of transcription elongation leading to DNA double-stranded breaks. At the break sites RPA proteins bind to the damaged DNA and recruit the ATR kinase which phosphorylates P53 protein at its Ser-15 residue leading to P53 activation (166-168).

During my PhD work, we investigated a still uncharacterized P53 function in the process of transcription elongation. We examined the interaction between P53 and RNAPII under physiological and ActD treated conditions. We also investigated the binding of P53 at transcriptionally active gene regions and analyzed the occupancy of P53 and RNAPII at selected gene regions under normal circumstances and upon induction of transcription elongation blockage.

To examine P53 function during ActD induced transcription blockage, first we investigated whether low (5 nM) or high (200 nM) concentration of ActD induced apoptosis or it had any effects on the cell cycle. Upon 200 nM ActD treatment we detected a decreased cell number in G1 phase and an increased cell number in G2 phase, while we did not observe changes in the S phase upon ActD treatment. The accumulation of cells in the G2 phase suggests a cell cycle arrest in G2 phase, which explains the reduction in the cell number in G1 phase.

Upon ActD treatment the level of P53 protein increases, while the RPB1 protein level decreases. We found that the total P53 level is increased both upon 6 and 24 h of 5 and 200 nM ActD treatments. On the contrary, we detected Ser15-phosphorylated P53 only upon 200 nM ActD treatment, which supports that this post-translationally modified form of P53 is present only following transcription elongation blockage induced DNA double-strand breaks. On the other hand, RPB1, as well as the S5- and the S2-phosphorylated RPB1 levels were reduced mainly 24 h after high concentration of ActD treatment. These results indicate that P53 is stabilized, while RPB1 may be degraded upon transcription elongation blockage.

Our results also demonstrated that P53 co-localizes with S2- and S5-phosphorylated (S2P and S5P) forms of RPB1 upon high concentration of ActD treatment. Interestingly, 24 h after high concentration of ActD treatment, S2P and S5P RPB1 co-localize with P53 at

discrete nuclear foci, suggesting strong S2P RPB1-P53 and S5P RPB1-P53 interactions at locations where the transcription blockage results in DNA damage. We found that neither  $\gamma$ H2AX and S2P RPB1 nor  $\gamma$ H2AX and S5P RPB1 co-localized supporting the hypothesis that transcription is inhibited where DNA repair takes place. After 6 and 24 h ActD treatment,  $\gamma$ H2AX and p53 co-localize in discrete nuclear foci, marking the sites where active DNA damage repair takes place. We found that P53 interacts both with the initiating (S5P) and elongating form (S2P) of RPB1 under normal conditions and also upon ActD treatment. We concluded that the DNA damage response may result in complete transcriptional silencing at the DNA break sites.

Our results indicate that P53 binds to transcriptionally active gene regions upon transcription elongation blockage. By the re-analysis of already existing ChIP-seq data, we could classify genes into three distinct clusters depended on the occupancy of P53 at their different regions. Cluster 1 consists of the group of genes that show high P53 occupancy at the transcription start site. Cluster 2 genes show elevated P53 binding along the transcribed units. In case of Cluster 3, P53 could not be detected. These data suggest the existence of a correlation between P53 occupancy and gene expression level: P53 localizes on those genes, which show higher expression rate.

Since ChIP-seq data indicated that P53 localized at specific genes, we validated the binding of P53 at specific gene regions (promoter, gene body and 3'UTR) of selected groups of genes which included: *ActB* (Cluster 1), *Cdk12* (Cluster 1), *Brat1* (Cluster 1) and *Sdcbp* (Cluster 2). At most of the examined regions of randomly chosen 4 non-direct P53 target genes, P53 occupancy was increased upon 6 and 24 h transcription elongation blockage. On the other hand, RPB1 occupancy was reduced 6 h after ActD treatment and then restored after 24 h. *ActB*, however, behaved differently since P53 and RPB1 occupancies showed similar distributions on this gene.

We also investigated whether P53 played role in the removal of RNAPII by regulating its ubiquitylation. Upon transcription elongation blockage, 6 h after ActD treatment, the level of the ubiquitylated RPB1 was remarkably increased, while 24 h after the treatment, the amount of ubiquitylated RPB1 was reduced compared to the 6 h samples in the presence of P53. We detected a decreased amount of ubiquitylated S2P RPB1 following 6 and 24 h of transcription elongation blockage in cases when P53 expression was silenced. Additionally, in the absence of P53 S2P RPB1 level was higher 24 h after ActD treatment, than it was in the presence of P53 under similar condition. These results highlight a

mechanism by which the ubiquitylation of S2P RPB1 is somehow mediated by the P53 protein upon transcription elongation blockage. In accord with the results of the chromatin immunoprecipitation experiment, these data suggest that 6 h after transcription elongation blockage induction P53 plays a role in the ubiquitylation of the stalling RNAPII to allow access for the repair factors to the damaged DNA.

By further experiments we attempted to reveal whether RPB1 ubiquitylation implicates its proteasomal degradation upon transcription elongation blockage. We treated the cells with MG132 proteasome inhibitor and measured the RPB1 protein level upon ActD treatment. We found that the levels of both RPB1 and its transcriptionally active S2P and S5P forms remained nearly unchanged upon ActD treatment. In contrast to that, the protein levels of P53 also its Ser-15 phosphorylated form were reduced 24 h after ActD and MG132 treatment. These results support a hypothesis that upon stress conditions RPB1 is degraded by the 26S proteasome. On the other hand, the reduction in P53 protein level during proteasome inhibition could be the result of a proteasome-independent degradation of P53 protein. We hypothesized that P53 was degraded by Calpains and tested the change in P53 protein level upon ActD-induced transcription blockage in the presence of Calpain V inhibitor. We found that the P53 turn-over was unaffected since neither the unmodified nor the Ser-15 phosphorylated P53 could be detected 24 h after the treatments. Based on these findings, the reduced P53 protein level observed upon proteasome inhibitor treatment is not the consequence of its degradation by Calpain proteases, rather a still unknown mechanism could influence the P53 protein level in the cells in case of proteasome inhibition.

In summary, our data highlight that P53 can be localized to different regions of transcriptionally active genes, which are not direct targets of it. P53 can presumably bind to those regions through its interaction with RNAPII. Our results indicate that P53 has a role in transcription elongation during transcription blockage. We also showed that P53 plays role in the ubiquitin-dependent proteasomal degradation of RPB1 upon transcription elongation blockage. Consequently, our results suggest that upon transcription elongation blockage, P53 has a role in the removal of the stalled RPB1 from the chromatin to allow access for the repair factors to the damaged DNA. The results of my PhD work therefore provide a better understanding of the feed-back mechanisms by which cells can resolve the transcription blockage upon different stress conditions.

## 10. Irodalomjegyzék

1. Hajheidari, M., Koncz, C. and Eick, D. (2013) Emerging roles for RNA polymerase II CTD in Arabidopsis. *Trends in plant science*, **18**, 633-643.
2. Nikolov, D.B. and Burley, S.K. (1997) RNA polymerase II transcription initiation: a structural view. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 15-22.
3. Amaral, J.D., Castro, R.E., Steer, C.J. and Rodrigues, C.M. (2009) p53 and the regulation of hepatocyte apoptosis: implications for disease pathogenesis. *Trends in molecular medicine*, **15**, 531-541.
4. Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D. and Pavletich, N.P. (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science*, **265**, 346-355.
5. Sentenac, A. (1985) Eukaryotic RNA polymerases. *CRC critical reviews in biochemistry*, **18**, 31-90.
6. Corden, J.L. (1990) Tails of RNA polymerase II. *Trends in biochemical sciences*, **15**, 383-387.
7. Hsin, J.P. and Manley, J.L. (2012) The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes & development*, **26**, 2119-2137.
8. Saunders, A., Core, L.J. and Lis, J.T. (2006) Breaking barriers to transcription elongation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **7**, 557-567.
9. Conaway, R.C. and Conaway, J.W. (1997) General transcription factors for RNA polymerase II. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, **56**, 327-346.
10. Wade, J.T. and Struhl, K. (2008) The transition from transcriptional initiation to elongation. *Current opinion in genetics & development*, **18**, 130-136.
11. Pokholok, D.K., Hannett, N.M. and Young, R.A. (2002) Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression in vivo. *Molecular cell*, **9**, 799-809.
12. Sawadogo, M. and Roeder, R.G. (1985) Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. *Cell*, **43**, 165-175.
13. Tora, L. (2002) A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes & development*, **16**, 673-675.
14. Zawel, L. and Reinberg, D. (1993) Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multi-step process. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, **44**, 67-108.
15. Bryant, G.O., Martel, L.S., Burley, S.K. and Berk, A.J. (1996) Radical mutations reveal TATA-box binding protein surfaces required for activated transcription in vivo. *Genes & development*, **10**, 2491-2504.
16. Tan, S., Conaway, R.C. and Conaway, J.W. (1995) Dissection of transcription factor TFIIF functional domains required for initiation and elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 6042-6046.
17. Yokomori, K., Verrijzer, C.P. and Tjian, R. (1998) An interplay between TATA box-binding protein and transcription factors IIE and IIA modulates DNA binding and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6722-6727.
18. Kuldell, N.H. and Buratowski, S. (1997) Genetic analysis of the large subunit of yeast transcription factor IIE reveals two regions with distinct functions. *Molecular and cellular biology*, **17**, 5288-5298.

19. Holstege, F.C., Tantin, D., Carey, M., van der Vliet, P.C. and Timmers, H.T. (1995) The requirement for the basal transcription factor IIE is determined by the helical stability of promoter DNA. *Embo J*, **14**, 810-819.
20. Holstege, F.C., van der Vliet, P.C. and Timmers, H.T. (1996) Opening of an RNA polymerase II promoter occurs in two distinct steps and requires the basal transcription factors IIE and IIH. *Embo J*, **15**, 1666-1677.
21. Drapkin, R. and Reinberg, D. (1994) The multifunctional TFIID complex and transcriptional control. *Trends in biochemical sciences*, **19**, 504-508.
22. Svejstrup, J.Q., Wang, Z., Feaver, W.J., Wu, X., Bushnell, D.A., Donahue, T.F., Friedberg, E.C. and Kornberg, R.D. (1995) Different forms of TFIID for transcription and DNA repair: holo-TFIID and a nucleotide excision repairosome. *Cell*, **80**, 21-28.
23. Roeder, R.G. (2005) Transcriptional regulation and the role of diverse coactivators in animal cells. *FEBS letters*, **579**, 909-915.
24. Wilson, M.D., Harreman, M. and Svejstrup, J.Q. (2013) Ubiquitylation and degradation of elongating RNA polymerase II: the last resort. *Biochimica et biophysica acta*, **1829**, 151-157.
25. Hsin, J.P., Sheth, A. and Manley, J.L. (2011) RNAP II CTD Phosphorylated on Threonine-4 Is Required for Histone mRNA 3' End Processing. *Science*, **334**, 683-686.
26. Akhtar, M.S., Heidemann, M., Tietjen, J.R., Zhang, D.W., Chapman, R.D., Eick, D. and Ansari, A.Z. (2009) TFIID kinase places bivalent marks on the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Molecular cell*, **34**, 387-393.
27. Glover-Cutter, K., Kim, S., Espinosa, J. and Bentley, D.L. (2008) RNA polymerase II pauses and associates with pre-mRNA processing factors at both ends of genes. *Nat Struct Mol Biol*, **15**, 71-78.
28. Hintermair, C., Heidemann, M., Koch, F., Descostes, N., Gut, M., Gut, I., Fenouil, R., Ferrier, P., Flatley, A., Kremmer, E. *et al.* (2012) Threonine-4 of mammalian RNA polymerase II CTD is targeted by Polo-like kinase 3 and required for transcriptional elongation. *Embo J*, **31**, 2784-2797.
29. Baskaran, R., Chiang, G.G., Mysliwiec, T., Kruh, G.D. and Wang, J.Y. (1997) Tyrosine phosphorylation of RNA polymerase II carboxyl-terminal domain by the Abl-related gene product. *The Journal of biological chemistry*, **272**, 18905-18909.
30. Baskaran, R., Dahmus, M.E. and Wang, J.Y. (1993) Tyrosine phosphorylation of mammalian RNA polymerase II carboxyl-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 11167-11171.
31. Hausmann, S. and Shuman, S. (2002) Characterization of the CTD phosphatase Fcp1 from fission yeast. Preferential dephosphorylation of serine 2 versus serine 5. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 21213-21220.
32. Cho, E.J., Kobor, M.S., Kim, M., Greenblatt, J. and Buratowski, S. (2001) Opposing effects of Ctk1 kinase and Fcp1 phosphatase at Ser 2 of the RNA polymerase II C-terminal domain. *Genes & development*, **15**, 3319-3329.
33. Ganem, C., Devaux, F., Torchet, C., Jacq, C., Quevillon-Cheruel, S., Labesse, G., Facca, C. and Faye, G. (2003) Ssu72 is a phosphatase essential for transcription termination of snoRNAs and specific mRNAs in yeast. *Embo J*, **22**, 1588-1598.
34. Krishnamurthy, S., He, X., Reyes-Reyes, M., Moore, C. and Hampsey, M. (2004) Ssu72 Is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Molecular cell*, **14**, 387-394.
35. Bataille, A.R., Jeronimo, C., Jacques, P.E., Laramée, L., Fortin, M.E., Forest, A., Bergeron, M., Hanes, S.D. and Robert, F. (2012) A universal RNA polymerase II



- CTD cycle is orchestrated by complex interplays between kinase, phosphatase, and isomerase enzymes along genes. *Molecular cell*, **45**, 158-170.
36. Zhang, D.W., Mosley, A.L., Ramisetty, S.R., Rodriguez-Molina, J.B., Washburn, M.P. and Ansari, A.Z. (2012) Ssu72 phosphatase-dependent erasure of phospho-Ser7 marks on the RNA polymerase II C-terminal domain is essential for viability and transcription termination. *The Journal of biological chemistry*, **287**, 8541-8551.
  37. Kephart, D.D., Marshall, N.F. and Price, D.H. (1992) Stability of Drosophila RNA polymerase II elongation complexes in vitro. *Molecular and cellular biology*, **12**, 2067-2077.
  38. Marshall, N.F. and Price, D.H. (1992) Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. *Molecular and cellular biology*, **12**, 2078-2090.
  39. Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Ferdous, A., Imai, T., Hirose, S., Sugimoto, S., Yano, K., Hartzog, G.A., Winston, F. *et al.* (1998) DSIF, a novel transcription elongation factor that regulates RNA polymerase II processivity, is composed of human Spt4 and Spt5 homologs. *Genes & development*, **12**, 343-356.
  40. Yamaguchi, Y., Takagi, T., Wada, T., Yano, K., Furuya, A., Sugimoto, S., Hasegawa, J. and Handa, H. (1999) NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell*, **97**, 41-51.
  41. Adelman, K. and Lis, J.T. (2012) Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nature reviews. Genetics*, **13**, 720-731.
  42. Marshall, N.F. and Price, D.H. (1995) Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 12335-12338.
  43. Wada, T., Takagi, T., Yamaguchi, Y., Watanabe, D. and Handa, H. (1998) Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *Embo J*, **17**, 7395-7403.
  44. Fousteri, M. and Mullenders, L.H. (2008) Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Res*, **18**, 73-84.
  45. Nechaev, S., Fargo, D.C., dos Santos, G., Liu, L., Gao, Y. and Adelman, K. (2010) Global analysis of short RNAs reveals widespread promoter-proximal stalling and arrest of Pol II in Drosophila. *Science*, **327**, 335-338.
  46. Mellon, I., Spivak, G. and Hanawalt, P.C. (1987) Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*, **51**, 241-249.
  47. Bohr, V.A., Smith, C.A., Okumoto, D.S. and Hanawalt, P.C. (1985) DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell*, **40**, 359-369.
  48. Bregman, D.B., Halaban, R., van Gool, A.J., Henning, K.A., Friedberg, E.C. and Warren, S.L. (1996) UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: a novel modification deficient in Cockayne syndrome cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 11586-11590.
  49. Ratner, J.N., Balasubramanian, B., Corden, J., Warren, S.L. and Bregman, D.B. (1998) Ultraviolet radiation-induced ubiquitination and proteasomal degradation of the large subunit of RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair. *The Journal of biological chemistry*, **273**, 5184-5189.
  50. Mitsui, A. and Sharp, P.A. (1999) Ubiquitination of RNA polymerase II large subunit signaled by phosphorylation of carboxyl-terminal domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6054-6059.

51. Woudstra, E.C., Gilbert, C., Fellows, J., Jansen, L., Brouwer, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Svejstrup, J.Q. (2002) A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage. *Nature*, **415**, 929-933.
52. Anindya, R., Aygun, O. and Svejstrup, J.Q. (2007) Damage-induced ubiquitylation of human RNA polymerase II by the ubiquitin ligase Nedd4, but not Cockayne syndrome proteins or BRCA1. *Molecular cell*, **28**, 386-397.
53. Beaudenon, S.L., Huacani, M.R., Wang, G., McDonnell, D.P. and Huibregtse, J.M. (1999) Rsp5 ubiquitin-protein ligase mediates DNA damage-induced degradation of the large subunit of RNA polymerase II in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, **19**, 6972-6979.
54. Starita, L.M., Horwitz, A.A., Keogh, M.C., Ishioka, C., Parvin, J.D. and Chiba, N. (2005) BRCA1/BARD1 ubiquitinate phosphorylated RNA polymerase II. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 24498-24505.
55. Laine, J.P. and Egly, J.M. (2006) When transcription and repair meet: a complex system. *Trends Genet*, **22**, 430-436.
56. Kleiman, F.E., Wu-Baer, F., Fonseca, D., Kaneko, S., Baer, R. and Manley, J.L. (2005) BRCA1/BARD1 inhibition of mRNA 3' processing involves targeted degradation of RNA polymerase II. *Genes & development*, **19**, 1227-1237.
57. Daulny, A., Geng, F., Muratani, M., Geisinger, J.M., Salghetti, S.E. and Tansey, W.P. (2008) Modulation of RNA polymerase II subunit composition by ubiquitylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 19649-19654.
58. Rockx, D.A., Mason, R., van Hoffen, A., Barton, M.C., Citterio, E., Bregman, D.B., van Zeeland, A.A., Vrieling, H. and Mullenders, L.H. (2000) UV-induced inhibition of transcription involves repression of transcription initiation and phosphorylation of RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10503-10508.
59. Gillette, T.G., Gonzalez, F., Delahodde, A., Johnston, S.A. and Kodadek, T. (2004) Physical and functional association of RNA polymerase II and the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 5904-5909.
60. Perry, R.P. and Kelley, D.E. (1970) Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species. *Journal of cellular physiology*, **76**, 127-139.
61. Trask, D.K. and Muller, M.T. (1988) Stabilization of type I topoisomerase-DNA covalent complexes by actinomycin D. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 1417-1421.
62. Choong, M.L., Yang, H., Lee, M.A. and Lane, D.P. (2009) Specific activation of the p53 pathway by low dose actinomycin D: a new route to p53 based cyclotherapy. *Cell cycle*, **8**, 2810-2818.
63. Holzel, M., Orban, M., Hochstatter, J., Rohrmoser, M., Harasim, T., Malamoussi, A., Kremmer, E., Langst, G. and Eick, D. (2010) Defects in 18 S or 28 S rRNA processing activate the p53 pathway. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 6364-6370.
64. Vousden, K.H. and Prives, C. (2009) Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, **137**, 413-431.
65. Zhang, Y., Wang, J., Yuan, Y., Zhang, W., Guan, W., Wu, Z., Jin, C., Chen, H., Zhang, L., Yang, X. *et al.* (2010) Negative regulation of HDM2 to attenuate p53 degradation by ribosomal protein L26. *Nucleic acids research*, **38**, 6544-6554.
66. Chen, A.Y. and Liu, L.F. (1994) DNA topoisomerases: essential enzymes and lethal targets. *Annual review of pharmacology and toxicology*, **34**, 191-218.

67. Lacroix, M., Toillon, R.A. and Leclercq, G. (2006) p53 and breast cancer, an update. *Endocrine-related cancer*, **13**, 293-325.
68. Sionov, R.V. and Haupt, Y. (1999) The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*, **18**, 6145-6157.
69. El-Deiry, W.S. (2003) The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene*, **22**, 7486-7495.
70. Ozaki, T. and Nakagawara, A. (2011) Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. *Cancers*, **3**, 994-1013.
71. Nakano, K. and Vousden, K.H. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular cell*, **7**, 683-694.
72. Wu, G.S., Burns, T.F., McDonald, E.R., 3rd, Jiang, W., Meng, R., Krantz, I.D., Kao, G., Gan, D.D., Zhou, J.Y., Muschel, R. *et al.* (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nature genetics*, **17**, 141-143.
73. Kubbutat, M.H., Jones, S.N. and Vousden, K.H. (1997) Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*, **387**, 299-303.
74. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. and Oren, M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, **387**, 296-299.
75. Prives, C. and Hall, P.A. (1999) The p53 pathway. *The Journal of pathology*, **187**, 112-126.
76. Vousden, K.H. and Lu, X. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nature reviews. Cancer*, **2**, 594-604.
77. el-Deiry, W.S., Kern, S.E., Pietenpol, J.A., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1992) Definition of a consensus binding site for p53. *Nature genetics*, **1**, 45-49.
78. Funk, W.D., Pak, D.T., Karas, R.H., Wright, W.E. and Shay, J.W. (1992) A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Molecular and cellular biology*, **12**, 2866-2871.
79. Riley, T., Sontag, E., Chen, P. and Levine, A. (2008) Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **9**, 402-412.
80. Fabbro, M. and Henderson, B.R. (2003) Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. *Experimental cell research*, **282**, 59-69.
81. Kau, T.R., Schroeder, F., Ramaswamy, S., Wojciechowski, C.L., Zhao, J.J., Roberts, T.M., Clardy, J., Sellers, W.R. and Silver, P.A. (2003) A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer cell*, **4**, 463-476.
82. Stommel, J.M., Marchenko, N.D., Jimenez, G.S., Moll, U.M., Hope, T.J. and Wahl, G.M. (1999) A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *Embo J*, **18**, 1660-1672.
83. Brooks, C.L., Li, M. and Gu, W. (2007) Mechanistic studies of MDM2-mediated ubiquitination in p53 regulation. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 22804-22815.
84. Walker, K.K. and Levine, A.J. (1996) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15335-15340.
85. Baptiste, N., Friedlander, P., Chen, X. and Prives, C. (2002) The proline-rich domain of p53 is required for cooperation with anti-neoplastic agents to promote apoptosis of tumor cells. *Oncogene*, **21**, 9-21.
86. Vogan, K., Bernstein, M., Leclerc, J.M., Brisson, L., Brossard, J., Brodeur, G.M., Pelletier, J. and Gros, P. (1993) Absence of p53 gene mutations in primary neuroblastomas. *Cancer Res*, **53**, 5269-5273.

87. Crawford, L.V., Pim, D.C. and Lamb, P. (1984) The cellular protein p53 in human tumours. *Molecular biology & medicine*, **2**, 261-272.
88. Cattoretti, G., Rilke, F., Andreola, S., D'Amato, L. and Delia, D. (1988) P53 expression in breast cancer. *Int J Cancer*, **41**, 178-183.
89. Chen, P.L., Chen, Y.M., Bookstein, R. and Lee, W.H. (1990) Genetic mechanisms of tumor suppression by the human p53 gene. *Science*, **250**, 1576-1580.
90. Chin, K.V., Ueda, K., Pastan, I. and Gottesman, M.M. (1992) Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. *Science*, **255**, 459-462.
91. Cadwell, C. and Zambetti, G.P. (2001) The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene*, **277**, 15-30.
92. Deb, S., Jackson, C.T., Subler, M.A. and Martin, D.W. (1992) Modulation of cellular and viral promoters by mutant human p53 proteins found in tumor cells. *Journal of virology*, **66**, 6164-6170.
93. Dittmer, D., Pati, S., Zambetti, G., Chu, S., Teresky, A.K., Moore, M., Finlay, C. and Levine, A.J. (1993) Gain of function mutations in p53. *Nature genetics*, **4**, 42-46.
94. Ludes-Meyers, J.H., Subler, M.A., Shivakumar, C.V., Munoz, R.M., Jiang, P., Bigger, J.E., Brown, D.R., Deb, S.P. and Deb, S. (1996) Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. *Molecular and cellular biology*, **16**, 6009-6019.
95. Frazier, M.W., He, X., Wang, J., Gu, Z., Cleveland, J.L. and Zambetti, G.P. (1998) Activation of c-myc gene expression by tumor-derived p53 mutants requires a discrete C-terminal domain. *Molecular and cellular biology*, **18**, 3735-3743.
96. Lanyi, A., Deb, D., Seymour, R.C., Ludes-Meyers, J.H., Subler, M.A. and Deb, S. (1998) 'Gain of function' phenotype of tumor-derived mutant p53 requires the oligomerization/nonsequence-specific nucleic acid-binding domain. *Oncogene*, **16**, 3169-3176.
97. Scian, M.J., Stagliano, K.E., Deb, D., Ellis, M.A., Carchman, E.H., Das, A., Valerie, K., Deb, S.P. and Deb, S. (2004) Tumor-derived p53 mutants induce oncogenesis by transactivating growth-promoting genes. *Oncogene*, **23**, 4430-4443.
98. Graeber, T.G., Peterson, J.F., Tsai, M., Monica, K., Fornace, A.J., Jr. and Giaccia, A.J. (1994) Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Molecular and cellular biology*, **14**, 6264-6277.
99. Ohnishi, T., Wang, X., Ohnishi, K. and Takahashi, A. (1998) p53-dependent induction of WAF1 by cold shock in human glioblastoma cells. *Oncogene*, **16**, 1507-1511.
100. Zhan, Q., Carrier, F. and Fornace, A.J., Jr. (1993) Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest. *Molecular and cellular biology*, **13**, 4242-4250.
101. Liu, M., Pelling, J.C., Ju, J., Chu, E. and Brash, D.E. (1998) Antioxidant action via p53-mediated apoptosis. *Cancer Res*, **58**, 1723-1729.
102. Eller, M.S., Maeda, T., Magnoni, C., Atwal, D. and Gilchrest, B.A. (1997) Enhancement of DNA repair in human skin cells by thymidine dinucleotides: evidence for a p53-mediated mammalian SOS response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 12627-12632.
103. Linke, S.P., Clarkin, K.C., Di Leonardo, A., Tsou, A. and Wahl, G.M. (1996) A reversible, p53-dependent G0/G1 cell cycle arrest induced by ribonucleotide

- depletion in the absence of detectable DNA damage. *Genes & development*, **10**, 934-947.
104. Murphy, M., Ahn, J., Walker, K.K., Hoffman, W.H., Evans, R.M., Levine, A.J. and George, D.L. (1999) Transcriptional repression by wild-type p53 utilizes histone deacetylases, mediated by interaction with mSin3a. *Genes & development*, **13**, 2490-2501.
  105. Zhang, Y., Wang, J.S., Chen, L.L., Zhang, Y., Cheng, X.K., Heng, F.Y., Wu, N.H. and Shen, Y.F. (2004) Repression of hsp90beta gene by p53 in UV irradiation-induced apoptosis of Jurkat cells. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 42545-42551.
  106. Ho, J.S., Ma, W., Mao, D.Y. and Benchimol, S. (2005) p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest. *Molecular and cellular biology*, **25**, 7423-7431.
  107. Lin, T., Chao, C., Saito, S., Mazur, S.J., Murphy, M.E., Appella, E. and Xu, Y. (2005) p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression. *Nature cell biology*, **7**, 165-171.
  108. Lohr, K., Moritz, C., Contente, A. and Dobbelstein, M. (2003) p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53. *The Journal of biological chemistry*, **278**, 32507-32516.
  109. Xiong, Y., Hannon, G.J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R. and Beach, D. (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, **366**, 701-704.
  110. Niculescu, A.B., 3rd, Chen, X., Smeets, M., Hengst, L., Prives, C. and Reed, S.I. (1998) Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Molecular and cellular biology*, **18**, 629-643.
  111. Delavaine, L. and La Thangue, N.B. (1999) Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. *Oncogene*, **18**, 5381-5392.
  112. Harbour, J.W. and Dean, D.C. (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes & development*, **14**, 2393-2409.
  113. Lee, K.C., Crowe, A.J. and Barton, M.C. (1999) p53-mediated repression of alpha-fetoprotein gene expression by specific DNA binding. *Molecular and cellular biology*, **19**, 1279-1288.
  114. Beckerman, R. and Prives, C. (2010) Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **2**, a000935.
  115. Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Craig, R.W. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res*, **51**, 6304-6311.
  116. Clarke, A.R., Purdie, C.A., Harrison, D.J., Morris, R.G., Bird, C.C., Hooper, M.L. and Wyllie, A.H. (1993) Thymocyte apoptosis induced by p53-dependent and independent pathways. *Nature*, **362**, 849-852.
  117. Lowe, S.W., Schmitt, E.M., Smith, S.W., Osborne, B.A. and Jacks, T. (1993) p53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature*, **362**, 847-849.
  118. Toledo, F. and Wahl, G.M. (2006) Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature Reviews Cancer*, **6**, 909-923.
  119. Lee, J.T. and Gu, W. (2010) The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. *Cell Death Differ*, **17**, 86-92.
  120. Brooks, C.L. and Gu, W. (2006) p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Molecular cell*, **21**, 307-315.

121. Bohgaki, M., Hakem, A., Halaby, M.J., Bohgaki, T., Li, Q., Bissey, P.A., Shloush, J., Kislinger, T., Sanchez, O., Sheng, Y. *et al.* (2013) The E3 ligase PIRH2 polyubiquitylates CHK2 and regulates its turnover. *Cell Death Differ*, **20**, 812-822.
122. Zhang, D., Zaugg, K., Mak, T.W. and Elledge, S.J. (2006) A role for the deubiquitinating enzyme USP28 in control of the DNA-damage response. *Cell*, **126**, 529-542.
123. Zhang, L., Nemzow, L., Chen, H., Lubin, A., Rong, X., Sun, Z., Harris, T.K. and Gong, F. (2015) The deubiquitinating enzyme USP24 is a regulator of the UV damage response. *Cell reports*, **10**, 140-147.
124. Nuaaman, M.M. and Benchimol, S. (2013) Proteasome-independent p53 degradation. *Cell Res*, **23**, 597-598.
125. Tao, T., Shi, H., Guan, Y.H., Huang, D.L., Chen, Y., Lane, D.P., Chen, J. and Peng, J.R. (2013) Def defines a conserved nucleolar pathway that leads p53 to proteasome-independent degradation. *Cell Res*, **23**, 620-634.
126. Boyd, S.D., Tsai, K.Y. and Jacks, T. (2000) An intact HDM2 RING-finger domain is required for nuclear exclusion of p53. *Nature cell biology*, **2**, 563-568.
127. Geyer, R.K., Yu, Z.K. and Maki, C.G. (2000) The MDM2 RING-finger domain is required to promote p53 nuclear export. *Nature cell biology*, **2**, 569-573.
128. Ljungman, M., O'Hagan, H.M. and Paulsen, M.T. (2001) Induction of ser15 and lys382 modifications of p53 by blockage of transcription elongation. *Oncogene*, **20**, 5964-5971.
129. Derheimer, F.A., O'Hagan, H.M., Krueger, H.M., Hanasoge, S., Paulsen, M.T. and Ljungman, M. (2007) RPA and ATR link transcriptional stress to p53. *P Natl Acad Sci USA*, **104**, 12778-12783.
130. Dumaz, N. and Meek, D.W. (1999) Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *Embo J*, **18**, 7002-7010.
131. Sakaguchi, K., Herrera, J.E., Saito, S., Miki, T., Bustin, M., Vassilev, A., Anderson, C.W. and Appella, E. (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes & development*, **12**, 2831-2841.
132. Ito, A., Lai, C.H., Zhao, X., Saito, S., Hamilton, M.H., Appella, E. and Yao, T.P. (2001) p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. *Embo J*, **20**, 1331-1340.
133. Fiscella, M., Ullrich, S.J., Zambrano, N., Shields, M.T., Lin, D., Leesmiller, S.P., Anderson, C.W., Mercer, W.E. and Appella, E. (1993) Mutation of the Serine 15 Phosphorylation Site of Human P53 Reduces the Ability of P53 to Inhibit Cell-Cycle Progression. *Oncogene*, **8**, 1519-1528.
134. Unger, T., Sionov, R.V., Moallem, E., Yee, C.L., Howley, P.M., Oren, M. and Haupt, Y. (1999) Mutations in serines 15 and 20 of human p53 impair its apoptotic activity. *Oncogene*, **18**, 3205-3212.
135. Arima, Y., Nitta, M., Kuninaka, S., Zhang, D., Fujiwara, T., Taya, Y., Nakao, M. and Saya, H. (2005) Transcriptional blockade induces p53-dependent apoptosis associated with translocation of p53 to mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 19166-19176.
136. Ljungman, M. and Zhang, F. (1996) Blockage of RNA polymerase as a possible trigger for u.v. light-induced apoptosis. *Oncogene*, **13**, 823-831.
137. O'Hagan, H.M. and Ljungman, M. (2004) Efficient NES-dependent protein nuclear export requires ongoing synthesis and export of mRNAs. *Experimental cell research*, **297**, 548-559.

138. Di Lello, P., Jenkins, L.M.M., Jones, T.N., Nguyen, B.D., Hara, T., Yamaguchi, H., Dikeakos, J.D., Appella, E., Legault, P. and Omichinski, J.G. (2006) Structure of the Tfb1/p53 complex: Insights into the interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIIH and the activation domain of p53. *Molecular cell*, **22**, 731-740.
139. Shinobu, N., Maeda, T., Aso, T., Ito, T., Kondo, T., Koike, K. and Hatakeyama, M. (1999) Physical interaction and functional antagonism between the RNA polymerase II elongation factor ELL and p53. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 17003-17010.
140. Balakrishnan, S.K. and Gross, D.S. (2008) The tumor suppressor p53 associates with gene coding regions and co-traverses with elongating RNA polymerase II in an in vivo model. *Oncogene*, **27**, 2661-2672.
141. Kim, S., Balakrishnan, K. and Gross, D.S. (2011) p53 Interacts with RNA Polymerase II through Its Core Domain and Impairs Pol II Processivity In Vivo. *Plos One*, **6**.
142. Schauer, T., Tombacz, I., Ciurciu, A., Komonyi, O. and Boros, I.M. (2009) Misregulated RNA Pol II C-terminal domain phosphorylation results in apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, **66**, 909-918.
143. Ye, T., Krebs, A.R., Choukrallah, M.A., Keime, C., Plewniak, F., Davidson, I. and Tora, L. (2011) seqMINER: an integrated ChIP-seq data interpretation platform. *Nucleic acids research*, **39**, e35.
144. Anamika, K., Gyenis, A., Poidevin, L., Poch, O. and Tora, L. (2012) RNA polymerase II pausing downstream of core histone genes is different from genes producing polyadenylated transcripts. *Plos One*, **7**, e38769.
145. Gyenis, A., Umlauf, D., Ujfaludi, Z., Boros, I., Ye, T. and Tora, L. (2014) UVB Induces a Genome-Wide Acting Negative Regulatory Mechanism That Operates at the Level of Transcription Initiation in Human Cells. *Plos Genet*, **10**.
146. Sobell, H.M. (1985) Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 5328-5331.
147. Ljungman, M., Zhang, F., Chen, F., Rainbow, A.J. and McKay, B.C. (1999) Inhibition of RNA polymerase II as a trigger for the p53 response. *Oncogene*, **18**, 583-592.
148. Kajstura, M., Halicka, H.D., Pryjma, J. and Darzynkiewicz, Z. (2007) Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, **71**, 125-131.
149. Pankotai, T., Bonhomme, C., Chen, D. and Soutoglou, E. (2012) DNAPKcs-dependent arrest of RNA polymerase II transcription in the presence of DNA breaks. *Nat Struct Mol Biol*, **19**, 276-U229.
150. Pankotai, T. and Soutoglou, E. (2013) Double strand breaks: hurdles for RNA polymerase II transcription? *Transcription*, **4**, 34-38.
151. Shanbhag, N.M., Rafalska-Metcalf, I.U., Balane-Bolivar, C., Janicki, S.M. and Greenberg, R.A. (2010) ATM-Dependent Chromatin Changes Silence Transcription In cis to DNA Double-Strand Breaks. *Cell*, **141**, 970-981.
152. Bregman, D.B., Halaban, R., vanGool, A.J., Henning, K.A., Friedberg, E.C. and Warren, S.L. (1996) UV-induced ubiquitination of RNA polymerase II: A novel modification deficient in cockayne syndrome cells. *P Natl Acad Sci USA*, **93**, 11586-11590.
153. Mitsui, A. and Sharp, P.A. (1999) Ubiquitination of RNA polymerase II large subunit signaled by phosphorylation of carboxyl-terminal domain. *P Natl Acad Sci USA*, **96**, 6054-6059.

154. Woudstra, E.C., Gilbert, C., Fellows, J., Jansen, L., Brouwer, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Svejstrup, J.Q. (2002) A Rad26-Def1 complex coordinates repair and RNA pol II proteolysis in response to DNA damage. *Nature*, **415**, 929-933.
155. Anindya, R., Aygun, O. and Svejstrup, J.Q. (2007) Damage-induced ubiquitylation of human RNA polymerase II by the ubiquitin ligase Nedd4, but not Cockayne syndrome proteins or BRCA1. *Molecular cell*, **28**, 386-397.
156. Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y. *et al.* (1998) Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, **281**, 1674-1677.
157. Shieh, S.Y., Ikeda, M., Taya, Y. and Prives, C. (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell*, **91**, 325-334.
158. Siliciano, J.D., Canman, C.E., Taya, Y., Sakaguchi, K., Appella, E. and Kastan, M.B. (1997) DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. *Genes & development*, **11**, 3471-3481.
159. Woo, R.A., McLure, K.G., Lees-Miller, S.P., Rancourt, D.E. and Lee, P.W. (1998) DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature*, **394**, 700-704.
160. Menendez, D., Nguyen, T.A., Freudenberg, J.M., Mathew, V.J., Anderson, C.W., Jothi, R. and Resnick, M.A. (2013) Diverse stresses dramatically alter genome-wide p53 binding and transactivation landscape in human cancer cells. *Nucleic acids research*, **41**, 7286-7301.
161. Walz, S., Lorenzin, F., Morton, J., Wiese, K.E., von Eyss, B., Herold, S., Rycak, L., Dumay-Odelot, H., Karim, S., Bartkuhn, M. *et al.* (2014) Activation and repression by oncogenic MYC shape tumour-specific gene expression profiles. *Nature*, **511**, 483-487.
162. Kim, J., Guermah, M. and Roeder, R.G. (2010) The Human PAF1 Complex Acts in Chromatin Transcription Elongation Both Independently and Cooperatively with SII/TFIIS. *Cell*, **140**, 491-503.
163. Tremeau-Bravard, A., Riedl, T., Egly, J.M. and Dahmus, M.E. (2004) Fate of RNA polymerase II stalled at a cisplatin lesion. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 7751-7759.
164. Cramer, P., Bushnell, D.A. and Kornberg, R.D. (2001) Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science*, **292**, 1863-1876.
165. Singh, S.K., Qiao, Z., Song, L., Jani, V., Rice, W., Eng, E., Coleman, R.A. and Liu, W.L. (2016) Structural visualization of the p53/RNA polymerase II assembly. *Genes & development*, **30**, 2527-2537.
166. Lohrum, M.A., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H., Hanlon, M. and Vousden, K.H. (2003) Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer cell*, **3**, 577-587.
167. Zhang, Y., Wolf, G.W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhart, W.A. and Xiong, Y. (2003) Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Molecular and cellular biology*, **23**, 8902-8912.
168. van Leeuwen, I. and Lain, S. (2009) Sirtuins and p53. *Advances in cancer research*, **102**, 171-195.



169. Selby, C.P. and Sancar, A. (1990) Transcription preferentially inhibits nucleotide excision repair of the template DNA strand in vitro. *The Journal of biological chemistry*, **265**, 21330-21336.
170. Donahue, B.A., Yin, S., Taylor, J.S., Reines, D. and Hanawalt, P.C. (1994) Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 8502-8506.
171. Scharf, A., Grozdanov, P.N., Veith, R., Kubitscheck, U., Meier, U.T. and von Mikecz, A. (2011) Distant positioning of proteasomal proteolysis relative to actively transcribed genes. *Nucleic acids research*, **39**, 4612-4627.
172. Tai, E. and Benchimol, S. (2009) TRIMming p53 for ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 11431-11432.
173. Gonen, H., Shkedy, D., Barnoy, S., Kosower, N.S. and Ciechanover, A. (1997) On the involvement of calpains in the degradation of the tumor suppressor protein p53. *FEBS letters*, **406**, 17-22.
174. Pariat, M., Carillo, S., Molinari, M., Salvat, C., Debussche, L., Bracco, L., Milner, J. and Piechaczyk, M. (1997) Proteolysis by calpains: A possible contribution to degradation of p53. *Molecular and cellular biology*, **17**, 2806-2815.
175. Schauer, T., Tombacz, I., Ciurciu, A., Komonyi, O. and Boros, I.M. (2009) Misregulated RNA Pol II C-terminal domain phosphorylation results in apoptosis. *Cell Mol Life Sci*, **66**, 909-918.

## 11. Rövidítések jegyzéke

ABL: Abelson murine leukemia viral oncogene

ACTB: Actin B

AFP: Alfa-fetoprotein

AGV: Annotált gén vége

AktD: Aktinomicin D

ASNS: Asparagine synthetase

ATM: Ataxia telangiectasia mutated

ATR: Ataxia telangiectasia and Rad3-related

BARD1: BRCA1-associated RING domain protein 1

BCL-2: B-cell lymphoma 2

BRAT1: BRCA1-associated ATM activator 1

BRCA1: Breast cancer 1

BSA: Bovine serum albumin

CBB: Coomassie Brilliant Blue

CBP: CREB-binding protein

CDK: Cyclin dependent kinase

ChIP: Chromatin immunoprecipitation

COP1: Constitutively photomorphogenic 1

CPD: Cyclobutane pyrimidine dimer

CRM1: Chromosomal region maintenance 1

CTD: C-terminális domén

CSA: Cockayne syndrome A

DEF1: RNA polymerase II degradation factor 1

DKD: DNS-kötő domén

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetil-szulfoxid

DNAPK: DNA-dependent protein kinase

DRB: 5,6-Dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole

DSBR: Double-strand break repair

DSIF: DRB sensitivity inducing factor

DUB: Deubiquitylating enzyme

ECL: Enhanced chemiluminescent

EGFR: Epidermal growth factor receptor

ELL: Eleven-Nineteen Lysine Rich Leukemia

ERCC2: Excision Repair Cross-Complementation Group 2

ERCC3: Excision Repair Cross-Complementation Group 3

FACS: Fluorescence-activated cell sorting

FCS: Fetal calf serum

FGF: Fibroblast growth factor

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

HDAC: Histone deacetylase

HDM2: Human double minute 2

HNF3: Hepatocyte nuclear factor 3

hPAF1C: Human polymerase associated factor 1 complex

HRP: Horseradish peroxidase

IGF-1: Insulin-like growth factor 1

IL-6: Interleukin-6

MAP4: Microtubule-associated protein 4

MDM2: Murine double minute 2

MDR: Multiple drug resistance gene

miR-34a: Micro ribonucleic acid-34a

MNáz: Micrococcal nuclease

mRNS: Messenger ribonukleinsav

MYC: Myelocytomatosis oncogene

NAC: No antibody control

NEDD4: Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated protein 4

NELF: Negative elongation factor

NER: Nucleotide excision repair

NES: Nuclear export signal

NF-Y: Nuclear factor Y

NLS: Nuclear localisation signal

NTD: N-terminális domén

PBS: Phosphate-buffered saline

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

PGR: Prolin-gazdag régió

PIC: Pre-initiation complex; Protease inhibitor cocktail

FIG3: Tumor protein P53 inducible protein 3  
 PIRH2: P53-induced protein with a RING-H2 domain  
 PLK3: Polo-like kinase 3  
 6-4-PP: 6-4 photoproduct  
 P-TEFb: Positive transcription elongation factor b  
 RB: Retinoblastoma  
 RNSP: RNS polimeráz  
 RPA: Replication protein A  
 rRNS: Riboszómális ribonukleinsav  
 RPB1: RNS polimeráz II legnagyobb alegysége  
 SDCBP: Syndecan binding protein  
 SF1: Splicing factor 1  
 TAD: Transzaktivációs domén  
 TAF: TBP-associated factors  
 TAT-SF1: Tat-specific factor 1  
 TBP: TATA-binding protein  
 TBS: Tris-buffered saline  
 TC-NER: Transcription-coupled nucleotide excision repair  
 TERT: Telomerase reverse transcriptase  
 TET: Ten-eleven translocation  
 TIC: Total input control  
 TF: Transzkripció faktor  
 tRNS: Transzfer ribonukleinsav  
 TSH: Transzkripció start hely  
 TSR: Transcriptional stress response  
 TUBE: Tandem ubiquitin binding entity  
 USP24: Ubiquitin specific peptidase 24  
 UTR: Untranslated region

## 12. Publikációs lista

### A disszertáció alapjául szolgáló publikáció:

Human p53 interacts with the elongating RNAPII complex and is required for the release of actinomycin D induced transcription blockage

**Barbara N. Borsos**, Ildikó Huliák, Hajnalka Majoros, Zsuzsanna Ujfaludi, Ákos Gyenis, Peter Pukler, Imre M. Boros, Tibor Pankotai

Sci. Rep. 2017 Jan 19, 40960; doi: 10.1038/srep40960

### Egyéb publikációk:

Acetylations of Ftz-F1 and histone H4K5 are required for the fine-tuning of ecdysone biosynthesis during *Drosophila* metamorphosis

**Barbara N. Borsos**, Tibor Pankotai, Dávid Kovács, Christina Popescu, Zoltán Páhi, Imre M. Boros

Dev Biol. 2015 May 8. pii: S0012-1606(15)00239-0. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.04.020.

Gut region-specific accumulation of reactive oxygen species leads to regionally distinct activation of antioxidant and apoptotic marker molecules in rats with STZ-induced diabetes

Zsanett Jancsó, Nikolett Bódi, **Barbara Borsos**, Éva Fekete, Edit Hermes

Int J Biochem Cell Biol. 2015 Mar 18. pii: S1357-2725(15)00074-6. doi: 10.1016/j.biocel.2015.03.005

dTAF10- and dTAF10b-Containing Complexes Are Required for Ecdysone-Driven Larval-Pupal Morphogenesis in *Drosophila melanogaster*.

Zoltán Páhi, Zsuzsanna Kiss, Orbán Komonyi, **Barbara N. Borsos**, László Tora, Imre M. Boros, Tibor Pankotai

PLoS One. 2015 Nov 10;10(11):e0142226. doi: 10.1371/journal.pone.0142226. eCollection 2015.

### 13. Támogatások

- Kutatóegyetemi és Kiválósági EMMI támogatás [29-39-0T147]
- A kromatin szerkezeti változások szerepének azonosítása a kettős szálú DNS törések javításában OTKA-PD [112118]
- A tehetség értékének kibontakoztatása a Szegedi Tudományegyetem kiválósága érdekében [TÁMOP-4.2.2.B-15/1/KONV-2015-0006]
- A genom instabilitás és a karcinogenezis molekuláris térképezése, MolMedEx TUMORDNS GINOP 2.3.2-15-2016-00020